

Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon

19-2.2-06-PHYTO

DURÉE DU PROJET : AVRIL 2019 / DÉCEMBRE 2024

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Anne Piuze-Paquet, Phytodata

Hervé Van der Heyden, Phytodata (2019-2024)

Collaborateurs:

Odile Carisse, Agriculture et Agroalimentaire Canada

Anne-Sophie Walker, INRA

Échantillonnage :

Chloé Gendre, Club agroenvironnemental de l'Estrie

Julie Street, Durasol

Jacynthe Paré, Profit-eau-sol

Nadia Surdek, Pleine-Terre

Patrice Thibault, RLIO

Stéphanie Tellier, MAPAQ

Raphaël Fonclara, Dura Club

François Demers, Ecolo Max

Stéphanie Patenaude, Ferme Horticole Gagnon

Décembre 2024

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon

19-2.2-06-PHYTO

RÉSUMÉ

L'utilisation des fongicides a longtemps été considérée comme un moteur de l'intensification de l'agriculture moderne et a contribué au cours des dernières décennies à augmenter les rendements, améliorer la qualité des produits et stabiliser les productions. Cependant, le milieu agricole assiste à l'émergence de résistance à certaines des plus importantes classes de fongicides, compromettant le contrôle de plusieurs maladies. Malgré le recours à de bonnes pratiques agricoles combinées à l'utilisation raisonnée de fongicides, des pertes de contrôle ont été rapportées dans différentes régions du Québec au cours des dernières années.

L'objectif de ce projet visait donc à 1) réaliser une revue de littérature sur la résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides au Québec et ailleurs; 2) réaliser, à l'aide d'outils moléculaires et de phénotypage, un inventaire régional de la résistance pour *Botrytis cinerea* (moisissure grise, fraise et vigne), *Botrytis squamosa* (brûlure de la feuille, oignon), *Colletotrichum acutatum* (anthracnose, fraise); 3) documenter, à l'aide d'outils moléculaires, le problème de résistance pour les parasites obligatoires *Podosphaera aphanis* (blanc, fraise), *Plasmopara viticola* (mildiou, vigne) et *Erysiphe necator* (blanc, vigne) et 4) constituer une banque de souches de référence.

Une revue de littérature sur l'état de la résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides au Québec et ailleurs dans le monde ainsi qu'un inventaire de la résistance dans la culture de la fraise et de la vigne au Québec ont été réalisés dans le cadre de ce projet. Grâce à la mobilisation de nos collaborateurs, 3060 échantillons ont été recueillis dans 8 régions administratives. Pour *B. cinerea*, c'est 1140 échantillons qui ont été recueillis chez 66 producteurs, dont 44 producteurs de fraises et 22 producteurs de vigne (total de 117 champs); pour *C. acutatum*, c'est 690 échantillons qui ont été prélevés chez 34 producteurs de fraises (69 champs) et pour *B. squamosa*, 370 échantillons ont été recueillis chez 11 producteurs d'oignons (20 champs). De plus, l'échantillonnage des parasites obligatoires qui a débuté en 2021 a permis de prélever 320 échantillons de *P. viticola* (26 producteurs de vigne), 200 échantillons de *E. necator* (18 producteurs de vigne) et 330 échantillons de *P. aphanis* (23 producteurs de fraises).

En résumé, pour *B. cinerea* dans la vigne et la fraise, la proportion d'isolats résistants est très élevée pour les fongicides du groupe 11 (92%) et la proportion d'isolats résistants aux fongicides du groupe 7 demeure modérée (60%). Toutefois, la résistance atteint 86% pour le boscalide. La proportion d'isolats résistants au fenhexamide du groupe 17 est modérée (43%). Pour ce qui est de la résistance aux fongicides du groupe 9, 49% des isolats du présent projet y sont résistants. La proportion d'isolats résistants au fludioxonile est très faible (4%). Pour *C. acutatum*, la proportion d'isolats résistants est très élevée pour les fongicides du groupe 11 (97%), mais très faibles pour les groupes 9 et 12. Comme attendu, les isolats de *C. acutatum* sont tous insensibles aux principales matières actives du groupe 7. Pour *B. squamosa*, l'incidence de la résistance est plutôt élevée pour les fongicides des groupes 3, 7 et 11, soit entre 60% et 80%, mais modérée pour le pyriméthanile (39%) et très faible pour le fludioxonile (5%). Pour *P. viticola*, aucune souche résistante aux fongicides du groupe 40 n'a été détectée, toutefois 11% des isolats se sont avérés hétérozygotes, c'est-à-dire porteurs de la mutation conférant la résistance à ce groupe sur un des deux allèles du gène *cesA3*. Pour ce qui est de la résistance aux fongicides du groupe 11, la proportion des échantillons résistants est modérée (61%). Pour *E. necator*, la proportion moyenne des échantillons résistants aux fongicides des groupes 3, 7 et 11 est moyenne à élevée, soit respectivement 45%, 33% et 68%.

Cette recherche permet d'atteindre les objectifs de la stratégie phytosanitaire québécoise en incitant une réduction de l'utilisation de fongicides inutiles grâce à l'acquisition de connaissances pratiques et à la mobilisation des producteurs et de leurs conseillers.

OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif principal de ce projet consistait à documenter le problème de résistance aux fongicides dans différentes régions du Québec. Dans le cadre de ce projet, il s'agit des cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon. Les organismes suivants sont ciblés dans le cadre de ce projet : *Botrytis cinerea*, *Botrytis squamosa*, *Colletotrichum acutatum*, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* et *Podosphaera aphanis*. Les protocoles détaillés ont été présentés en début de projet et approuvés par le comité d'évaluation, ceux-ci se retrouvent à l'annexe I du présent rapport. Un résumé de ces protocoles est présenté ci-après.

Échantillonnage et collection de souches

L'échantillonnage a été réalisé grâce à la collaboration de conseillers de clubs conseils et du MAPAQ. Pour ce qui est de l'échantillonnage dans la vigne et la fraise, chaque conseiller a reçu en début de saison une trousse d'échantillonnage contenant des écouvillons, le protocole d'échantillonnage et une enveloppe retour préaffranchie. Pour chaque champ et chaque agent phytopathogène, 10 échantillons devaient être prélevés selon un parcours en « W ». Pour chaque échantillon, l'échantillonneur devait frotter l'extrémité d'un écouvillon sur une lésion avec sporulation et fournir : la date d'échantillonnage, les coordonnées de la ferme et du champ, la liste des fongicides utilisés et une cote de sévérité de la maladie (0 à 3) pour l'ensemble du champ. Une fois au laboratoire, les écouvillons de moisissure grise et d'anthracnose étaient frottés sur une gélose PDA contenant 100 ppm de novobiocine (isolation par épuisement) et incubés dans le noir pendant 24-48h. Suite à cette période d'incubation, des monocolonies étaient prélevées et repiquées sur gélose PDA (sans novobiocine). Pour s'assurer de ne pas perdre de souches et pour constituer une banque pouvant servir à d'autres recherches, chacune des souches isolées a été mise en conservation dans le sol à 4°C, pour une conservation à long terme. Dans le cas des écouvillons d'oïdium et de mildiou, ils ont été agités dans un tube vissé de 2 ml contenant 500 µl d'isopropanol afin de recueillir les spores et conservés à -20°C des prochaines étapes. Pour ce qui est de l'échantillonnage dans l'oignon, chaque échantillon était composé d'une dizaine de feuilles infectées. Les feuilles d'oignon ont été coupées en morceaux de 2 cm et placées dans une boîte de Pétri de 9 cm sur deux papiers filtres humidifiés. Les boîtes ont été laissées à température ambiante (18 °C à 23 °C) sous lumière naturelle pour favoriser la sporulation pendant 48 à 72 h. Les conidies ont été récoltées à l'aide d'un écouvillon stérile. Les conidies ont été transférées par étalement sur un milieu de culture PDA contenant 100 ppm de novobiocine. Les boîtes de Petri ont été placées à température ambiante pendant 48 à 72 h. Par identification visuelle, des colonies individuelles de *Botrytis spp.* ont été repiquées sur une boîte de Petri contenant une gélose PDA et incubées à température ambiante pendant 5 à 7 jours.

Phénotypage

Les essais de phénotypage servent à déterminer pour chaque fongicide, la concentration nécessaire pour inhiber la croissance du champignon de 50% (CI_{50}). C'est cette valeur qui permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à une matière active donnée. Elle sert également à comparer le niveau de résistance pour les différentes souches et de les classer en catégories de résistance. La CI_{50} est obtenue en ajustant un modèle non linéaire aux données de croissance obtenues pour différentes concentrations des matières actives testées. Pour y arriver, 7 doses ont été utilisées (0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5 et 50 ppm) pour chaque produit à l'essai. Dans le cadre de ce projet et en accord avec la communauté scientifique, nous avons choisi de travailler avec les matières actives

individuelles pour éviter l'effet confondu des adjuvants et autres agents de remplissage contenus dans les formulations commerciales. Par ailleurs, dans le cas des fongicides qui contiennent plus d'une matière active, il a été choisi de réaliser les essais pour chaque matière active individuellement à moins que les résultats de génotypage ne soient contradictoires. En effet, il est généralement admis qu'une souche ayant les mutations conférant un phénotype de résistance aux deux matières actives individuelles aura également un phénotype résistant lorsque les matières actives sont utilisées en mélange. On mesure ensuite la croissance mycélienne ou la germination des spores, soit par mesure directe (croissance radiale) ou au spectrophotomètre (germination des spores). Les deux approches ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Les bioessais de croissance mycélienne ont été effectués pour les isolats de *Colletotrichum acutatum*, et ce en utilisant des doses discriminantes, telles que déterminées par Fernandez-Ortuño et al. 2014, alors que les bioessais de germination des spores ont été effectués pour les isolats de *Botrytis cinerea* et de *Botrytis squamosa*, et ce par mesure de la densité optique selon le protocole de Stammler et Speakman (2006). Pour ce qui est des parasites obligatoires, faute d'avoir trouvé un étudiant de niveau maîtrise pour cet objectif du projet, il n'a malheureusement pas été possible d'effectuer les tests par bio essais sur disques foliaires, qui étaient nécessaires pour l'étape de phénotypage.

Calcul de la CI₅₀

À partir des valeurs de croissance obtenues à l'étape précédente, un modèle exponentiel décroissant à deux paramètres (EXD2) a été ajusté aux données afin d'estimer la CI₅₀ pour chacune des combinaisons « souche - matière active » testée. Le modèle EXD2 a été sélectionné après avoir évalué d'autres modèles, principalement des modèles log-logistique (LL2 et LL3) et Weibull (W2 et W3). La sélection du meilleur modèle était basée sur les critères de parcimonie (AIC et BIC) et les estimations de vraisemblance logarithmique. Ces analyses ont été réalisées avec le module « drc 3.0.6 » disponible pour la suite R (V 3.6.3).

Génotypage

L'ADN de chaque souche était extrait à l'aide de la trousse d'extraction commerciale FastDNA™ Kit (MP Biomedicals) selon le protocole du fabricant. La quantité et la qualité de l'ADN ont ensuite été évaluées au spectrophotomètre. Les extraits d'ADN étaient ensuite congelés jusqu'à leur utilisation. Pour déterminer s'il existe une relation entre le phénotype et le génotype, l'ADN de chaque souche était utilisé pour des fins de séquençage. Différents gènes ou régions géniques où se trouvent les mutations associées aux phénotypes résistants (*cytb*, *sdhB*, *OS-1*, *erg-27*, *CYP51* et *CesA3*) ont été préalablement sélectionnés. Une amplification par PCR était effectuée pour chaque souche et chaque région génique et les produits PCR étaient envoyés à la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du CHUL, pour y être séquencés. Les séquences obtenues étaient ensuite analysées et comparées aux séquences de références et chaque séquence était annotée selon qu'elle possédait la mutation responsable de la résistance ou non.

Relation phénotype-génotype

L'effet de chaque mutation détectée dans le cadre de l'inventaire sur la sensibilité des isolats aux fongicides a été décrit grâce au phénotypage de nombreuses souches. Cette étape permettait d'établir la relation entre la CI₅₀ des souches obtenues par bio essai et le génotype de celles-ci. Cette relation permettait d'interpréter adéquatement les résultats obtenus par biologie moléculaire. Effectuer les tests de détection de la résistance par biologie moléculaire, lorsque ceux-ci sont disponibles, est plus rapide que par bioessai, cette méthode est particulièrement avantageuse lorsqu'on souhaite traiter une grande quantité d'échantillons. De plus la méthode par biologie moléculaire permet d'éviter la manipulation de matières actives potentiellement dangereuses pour la santé humaine.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Revue de littérature

Une première version de la revue de littérature a été produite en 2020. Elle comprend des définitions pour les principaux termes utilisés, les mécanismes de résistance et les facteurs liés à leur développement, les mécanismes spécifiques, les méthodes de détection et un aperçu des niveaux de résistance pour certains agents pathogènes au Québec et ailleurs dans le monde. Dans cette démarche de revue de littérature, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont été utilisés pour expliquer certains des concepts présentés. La version finale de cette revue de littérature a été soumise avec le présent rapport (Annexe II).

Inventaire des résistances

Malgré une pression de la maladie variable d'une année à l'autre et grâce à la mobilisation de nos collaborateurs, 3060 échantillons ont été recueillis dans 8 régions administratives (Capitale nationale, Centre-du-Québec, Chaudière-Appalaches, Estrie, Mauricie, Laurentides, Lanaudière et Montérégie) (Figure 1). Pour *B. cinerea*, c'est 1140 échantillons qui ont été recueillis chez 44 producteurs de fraises et 22 producteurs de vigne (117 champs au total); pour *C. acutatum*, c'est 690 échantillons qui ont été prélevés chez 34 producteurs de fraises (69 champs) alors que pour *B. squamosa*, 260 échantillons ont été recueillis chez 11 producteurs d'oignons (20 champs). L'échantillonnage des parasites obligatoires a débuté en 2021, ce qui a permis de prélever 320 échantillons de *P. viticola* (26 producteurs de vignes), 200 échantillons de *E. necator* (18 producteurs de vigne) et 330 échantillons de *P. aphanis* (23 producteurs de fraises).

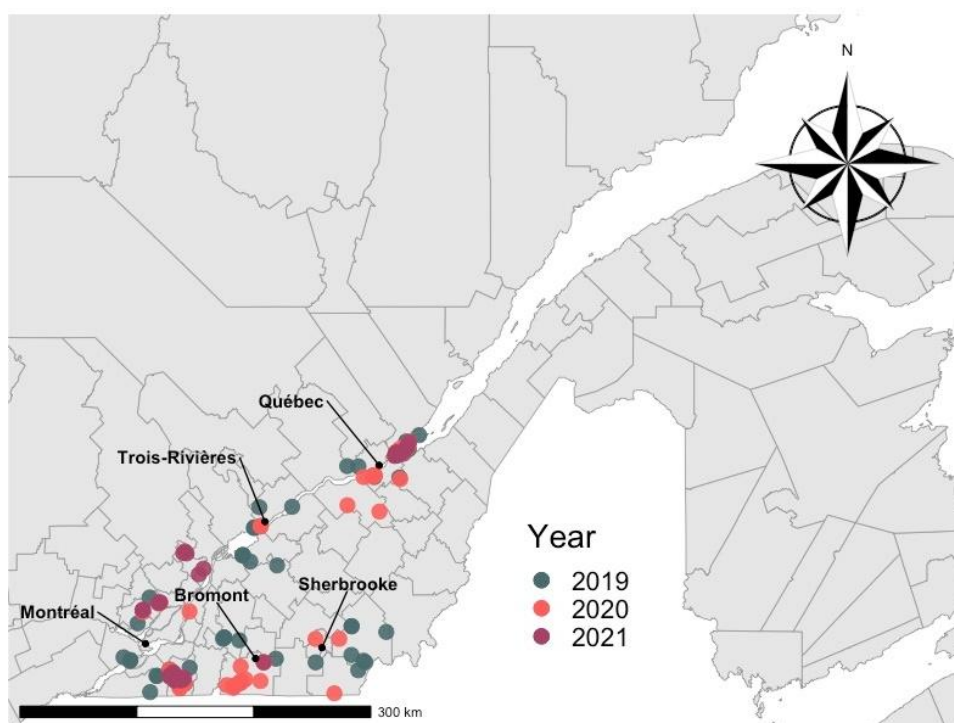


Figure 1. Distribution des sites échantillonnés entre 2019 et 2021 pour *Botrytis cinerea*, *Botrytis squamosa* et *Colletotrichum acutatum*

Tableau 1. Synthèse des échantillons de moisissure grise (*Botrytis cinerea*) reçus et testés dans le cadre du projet

| Année | Région administrative | Nombre d'écouvillons reçus | | Nombre de souches isolées et testées | |
|-----------|-----------------------|----------------------------|------------|--------------------------------------|------------|
| | | Fraise | Vigne | Fraise | Vigne |
| 2019 | Capitale-Nationale | 80 | 0 | 59 | 0 |
| 2019 | Centre-du-Québec | 50 | 0 | 49 | 0 |
| 2019 | Chaudière-Appalaches | 40 | 0 | 33 | 0 |
| 2019 | Estrie | 60 | 60 | 50 | 51 |
| 2019 | Laurentides | 30 | 0 | 25 | 0 |
| 2019 | Mauricie | 60 | 0 | 52 | 0 |
| 2019 | Montérégie | 50 | 80 | 49 | 69 |
| 2019 | TOTAL | 370 | 140 | 317 | 120 |
| 2020 | Capitale-Nationale | 90 | 0 | 65 | 0 |
| 2020 | Chaudière-Appalaches | 40 | 0 | 32 | 0 |
| 2020 | Estrie | 40 | 140 | 17 | 117 |
| 2020 | Laurentides | 30 | 0 | 30 | 0 |
| 2020 | Mauricie | 20 | 0 | 17 | 0 |
| 2020 | Montérégie | 0 | 60 | 0 | 49 |
| 2020 | TOTAL | 220 | 200 | 161 | 166 |
| 2021 | Capitale-Nationale | 100 | 0 | 78 | 0 |
| 2021 | Centre-du-Québec | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 2021 | Estrie | 0 | 10 | 0 | 6 |
| 2021 | Lanaudière | 20 | 0 | 15 | 0 |
| 2021 | Laurentides | 40 | 0 | 32 | 0 |
| 2021 | Montérégie | 0 | 10 | 0 | 10 |
| 2021 | TOTAL | 170 | 20 | 125 | 16 |
| 2019-2021 | TOTAL | 760 | 380 | 603 | 302 |

Résistance chez les agents phytopathogènes de la fraise et de la vigne

1. La moisissure grise (*Botrytis cinerea*)

1.1. Les strobilurines

Les strobilurines (groupe 11) comprennent les ingrédients actifs et produits suivants homologués pour la fraise et la vigne : pyraclostrobine, fluoxastrobine, trifloxystrobine, mandestrobin, et azoxystrobine. Ces ingrédients actifs sont parfois mélangés à d'autres dans la composition des produits suivants : trifloxystrobine + groupe 7 (LUNA SENSATION), pyraclostrobine + groupe 7 (MERIVON, PRISTINE) et azoxystrobine + groupe 3 (QUADRIS TOP). Parmi ces matières actives, l'azoxystrobine, le fluoxastrobine, le pyraclostrobine et le trifloxystrobine ont été testés en bioessais dans le cadre du projet pour un certain nombre de souches afin de confirmer la relation phénotype-génotype. Les mêmes matières actives ont été testées à la fois pour les souches isolées de la fraise et de la vigne.

Les résultats de CI_{50} des bioessais de résistance sont présentés ci-après sans distinction entre les cultures, l'objectif étant de vérifier la relation phénotype-génotype pour ensuite tester les souches que pour la mutation G143A conférant la résistance aux strobilurines. Ainsi, les résultats de CI_{50} des bioessais de résistance à l'azoxystrobine des souches sensibles (wt) variaient de 0.16 à 0.46 ppm alors que les CI_{50} des souches résistantes, sont celles portant la mutation G143A qui variaient de 6.16 à >50 ppm. Les résultats des bioessais de résistance au fluoxastrobine étaient très semblables avec des CI_{50} variant de 0.13 à 0.67 ppm pour les souches sensibles et des CI_{50} variant de 8.44 à >50 ppm pour les souches résistantes. Les bioessais avec le pyraclostrobine présentaient aussi des résultats allant dans ce sens avec des CI_{50} variant de 0.19 à 0.57 ppm pour les souches sensibles et des CI_{50} variant de 4.17 à 40.8 ppm pour les souches résistantes. Les résultats des bioessais de résistance au trifloxystrobine ont donné des résultats légèrement différents avec des CI_{50} variant de 0.19 à 4.94 ppm pour les souches sensibles et des CI_{50} de >50 ppm pour les souches résistantes.

Les isolats G143A, ont en effet une CI_{50} 10 à 100 fois plus élevée que les isolats du phénotype sauvage (wt) ou ceux qui possèdent un intron à cette position (Figure 3).

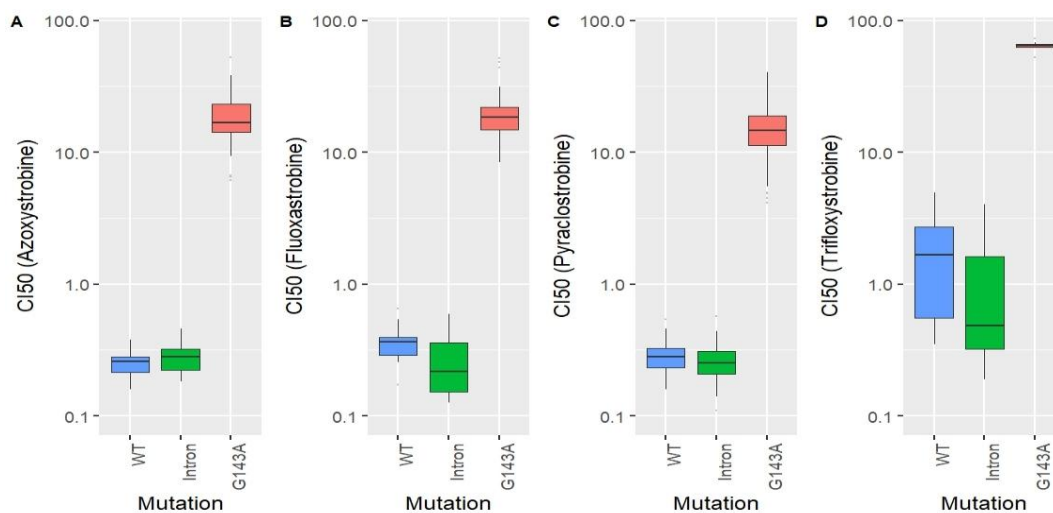


Figure 3 : Sensibilité des isolats de *Botrytis cinerea* isolés de la fraise et de la vigne confondue en 2019-2021 et possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières actives du groupe 11. Les valeurs de CI_{50} sont en ppm. Toutes les mutations ont été retrouvées sur le cytochrome b.

On observe également des patrons de résistance croisée entre les différentes matières actives du groupe 11 pour cette mutation. En effet, lorsque l'on compare les CI_{50} , obtenues en bioessais, on observe une forte corrélation entre les CI_{50} obtenues pour certaines paires de matières actives à l'étude ($R^2 = 0.96, 0.95$ et 0.95 , pour les paires azoxystrobine-fluoxastrobine, azoxystrobine-pyraclostrobine et pyraclostrobine-fluoxastrobine, respectivement), mais une corrélation moins forte entre les CI_{50} obtenus pour les paires impliquant le trifloxystrobine ($R^2 = 0.82, 0.79$ et 0.79 , pour les paires trifloxystrobine-azoxystrobine, trifloxystrobine-fluoxastrobine et trifloxystrobine-pyraclostrobine, respectivement) (Figure 4). Les pentes des droites de régression ne sont pas significativement différentes de 1 ($m = 1.0, 1.04$ et 0.95) pour les paires azoxystrobine-fluoxastrobine, azoxystrobine-pyraclostrobine et pyraclostrobine-fluoxastrobine, respectivement, ce qui suggère que la réponse des isolats de type mutant (G143A) et de type sauvage (wt) est similaire pour ces matières actives. Les pentes des droites de régression pour les paires avec le trifloxystrobine sont respectivement de $m = 0.77, 0.76$ et 0.69 pour les paires trifloxystrobine-azoxystrobine, trifloxystrobine-fluoxastrobine et trifloxystrobine-pyraclostrobine, respectivement.

azoxystrobine, trifloxystrobine-fluoxastrobine et trifloxystrobine-pyraclostrobine. Les valeurs de CI_{50} sont beaucoup plus élevées pour le trifloxystrobine (moyenne au-delà de 100 ppm) que pour l'azoxystrobine, le fluoxastrobine et le pyraclostrobine (moyennes de 19.74, 20.57 et 16.03 ppm respectivement). Le facteur de résistance de 10 à 100 est toutefois respecté entre les CI_{50} des isolats G143A et des isolats wt ou possédant un intron pour le trifloxystrobine (Figure 4). Le fait que les CI_{50} des souches soient plus élevées pour le trifloxystrobine que pour les autres strobilurines testées est difficilement explicable et ne concorde pas avec les résultats obtenus par Weber et Hahn (2011), étude dans laquelle l'inverse a été observé. Il pourrait s'agir d'une question de méthodologie ou de choix de milieux de culture, des tests supplémentaires seraient nécessaires pour bien comprendre cette différence.

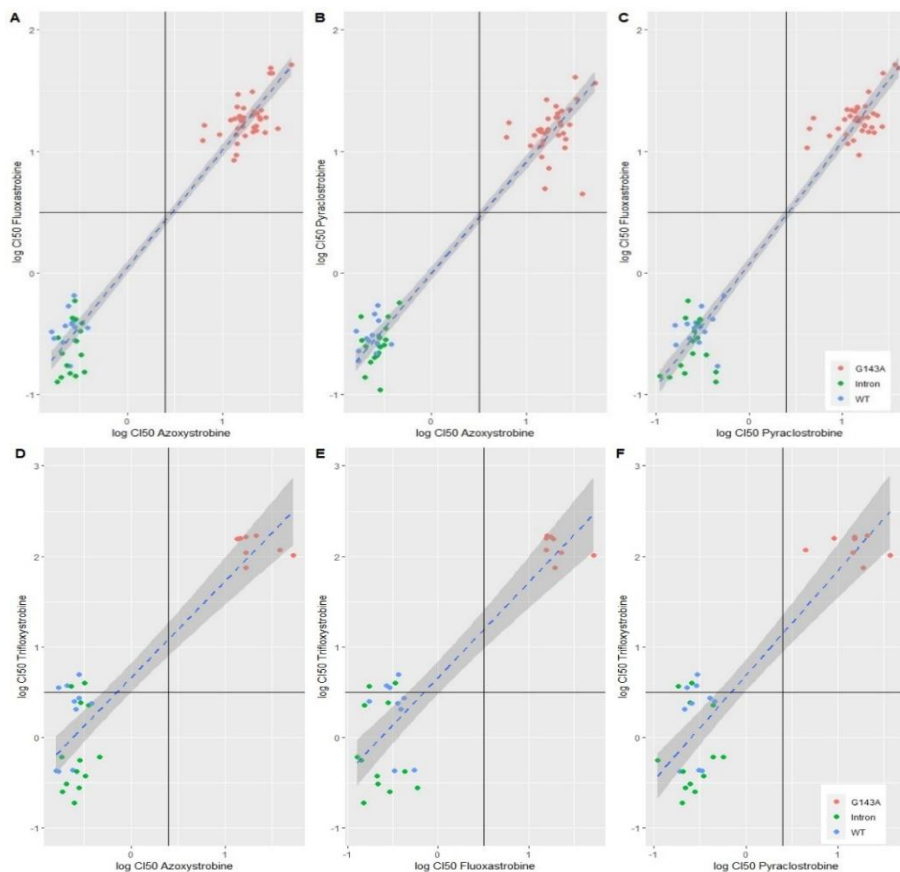


Figure 4: Patrons de résistance croisée observés par paire pour quatre fongicides du groupe 11, en A) azoxystrobine et fluoxastrobine, en B) azoxystrobine et pyraclostrobine, en C) pyraclostrobine et fluoxastrobine, en D) azoxystrobine et trifloxystrobine, en E) fluoxastrobine et trifloxystrobine et en F) pyraclostrobine et trifloxystrobine. Les points bleus représentent les isolats ne possédant pas la mutation G143A, les points verts représentent les isolats possédant un intron et les points rouges représentent les isolats possédant la mutation.

Les proportions d'isolats possédant la mutation conférant la résistance aux strobilurines sont extrêmement élevées dans toutes les régions du Québec. En effet, la proportion d'isolats porteurs de cette substitution varie de 67% à 100% selon la culture et la région (Tableau 2). En effet, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet suggèrent des niveaux de résistance élevés aux strobilurines dans la fraise et dans la vigne, soit 93.5% dans la fraise et 90.1% dans la vigne (Figure 2a et 2b).

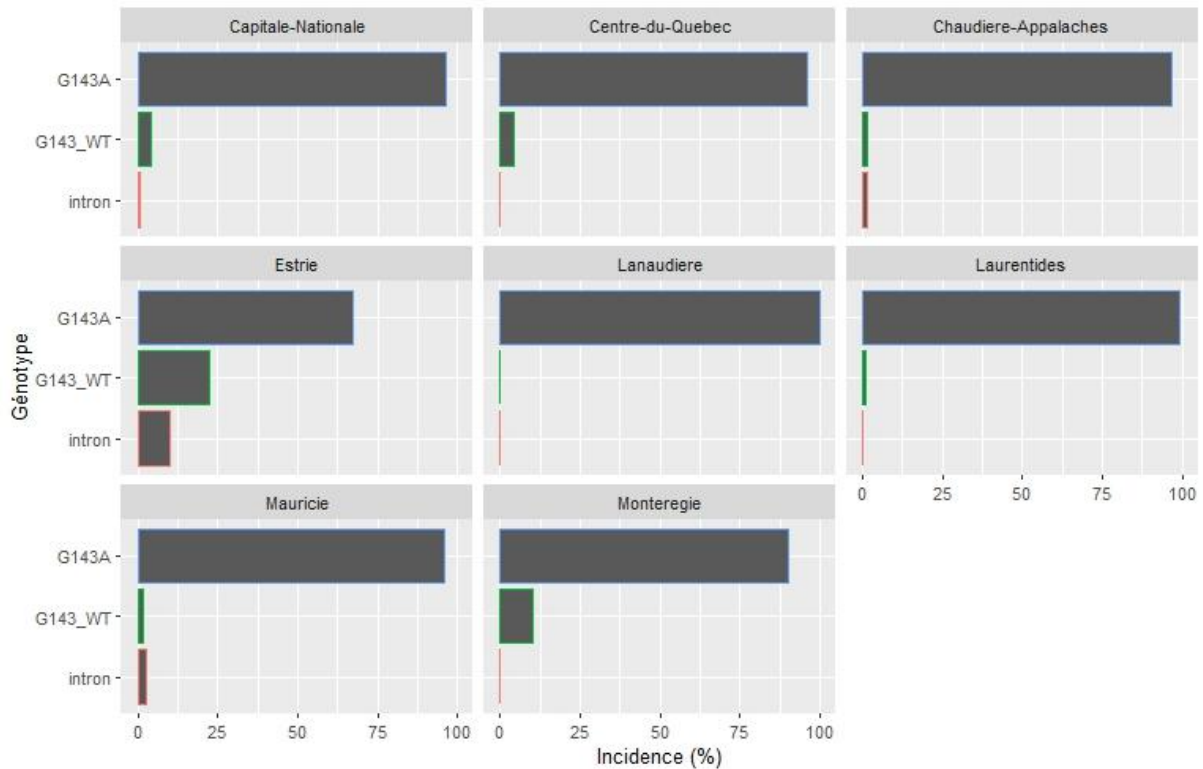


Figure 2a: Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 11 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée. Le génotype G143A est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que les génotypes G143_wt et porteurs d'intron sont sensibles.

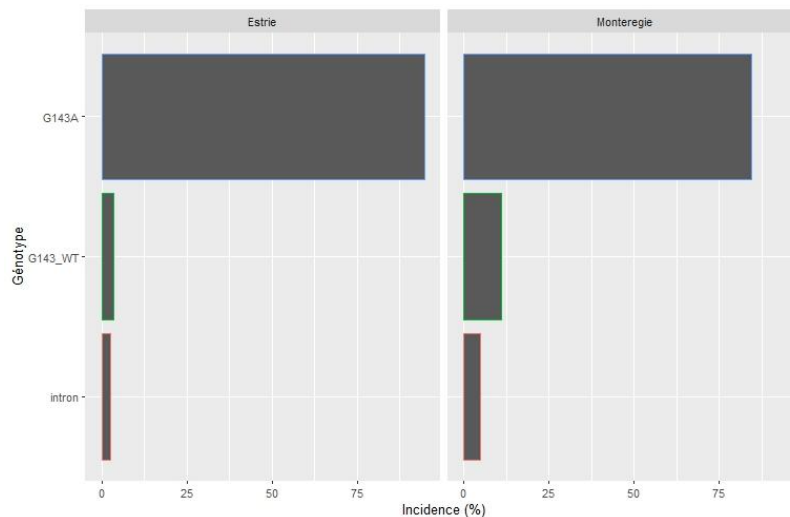


Figure 2b: Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 11 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la vigne pour chaque région échantillonnée. Le génotype G143A est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que les génotypes G143_wt et porteurs d'intron sont sensibles.

Tableau 2. Synthèse du pourcentage des mutations détectées chez les souches de *Botrytis cinerea* testées entre 2019 et 2021

| FRAC | Mutations | Capitale- Nationale | Centre-du- Québec | Chaudière- Appalaches | Estrie | | Lanaudière | Laurentides | Mauricie | Montérégie | |
|------|-----------|------------------------|----------------------|--------------------------|--------|-------|------------|-------------|----------|------------|-------|
| | | Frais | Fraise | Fraise | Fraise | Vigne | Fraise | Fraise | Fraise | Fraise | Vigne |
| 11 | G143A | 96,5 | 95,9 | 97,0 | 67,2 | 94,8 | 100 | 99,0 | 95,6 | 90,0 | 84,4 |
| | Intron | 0,5 | 0,0 | 1,5 | 10,3 | 2,4 | 0,0 | 0,0 | 2,9 | 0,0 | 4,7 |
| | WT | 3 | 4,1 | 1,5 | 22,4 | 3,6 | 0,0 | 1,0 | 1,5 | 10,0 | 10,9 |
| 7 | H272R | 6,9 | 22,5 | 6,1 | 55,2 | 51,7 | 53,3 | 12,6 | 20,8 | 16,0 | 22,7 |
| | H272V | 0,5 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | H272Y | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 2,2 | 4,0 | 1,6 |
| | N230I | 81,2 | 61,2 | 87,7 | 10,3 | 14,4 | 33,3 | 73,8 | 35,4 | 66,0 | 23,4 |
| | P225F | 3,0 | 6,1 | 3,1 | 0,0 | 20,1 | 6,7 | 5,8 | 15,7 | 4,0 | 20,3 |
| | P225H | 0,0 | 0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,8 |
| | WT | 7,9 | 8,2 | 3,1 | 34,5 | 10,9 | 6,7 | 7,8 | 25,3 | 10,0 | 31,3 |
| 17 | F412C | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | F412I | 5,0 | 8,2 | 4,6 | 1,7 | 2,3 | 0,0 | 7,8 | 5,1 | 2,0 | 6,3 |
| | F412S | 51,2 | 32,7 | 46,2 | 27,6 | 11,5 | 73,3 | 50,5 | 15,8 | 36,0 | 7,9 |
| | F412V | 8,5 | 2,0 | 13,8 | 3,4 | 1,1 | 0,0 | 11,6 | 1,7 | 4,0 | 0,8 |
| | WT | 35,3 | 57,1 | 35,4 | 65,5 | 85,1 | 26,7 | 30,1 | 77,4 | 58,0 | 85,0 |
| 2 | I365N | 74,3 | 69,4 | 73,9 | 37,9 | 16,1 | 66,7 | 73,8 | 30,9 | 64,0 | 18,0 |
| | I365S | 12,4 | 12,2 | 21,5 | 20,7 | 13,2 | 20,0 | 20,4 | 18,0 | 24,0 | 15,6 |
| | Q369P | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 16,7 | 0,0 | 0,0 | 15,7 | 0,0 | 21,9 |
| | WT | 12,9 | 18,4 | 4,6 | 39,7 | 54,0 | 13,3 | 5,8 | 35,4 | 12,0 | 44,5 |

1.2 Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (groupe 7) comprennent les ingrédients actifs homologués pour la fraise et la vigne : boscalide; penthiopyrade, isofétamide ; fluxapyroxade ; et fluopyram. Ces ingrédients actifs sont parfois mélangés à d'autres dans la composition des produits suivants : fluopyram + groupe 11 (LUNA SENSATION), fluxapyroxade + groupe 11 (MERIVON), pydiflumétofène + groupe 12 (MIRAVIS PRIME) et boscalide + groupe 11 (PRISTINE). Parmi ces matières actives, le boscalide, le fluopyram, le fluxapyroxad et le pydiflumétofène ont été testés en bioessais dans le cadre du projet pour un certain nombre de souches afin de confirmer la relation phénotype-génotype. Les mêmes matières actives ont été testées à la fois pour les souches isolées de la fraise et de la vigne.

La résistance aux matières actives du groupe 7 est également associée à la présence de mutations, cette fois sur le gène *sdh* codant pour la succinate déshydrogénase. Cependant, contrairement à la résistance au groupe 11, la résistance aux fongicides du groupe 7 est associée à au moins 11 mutations, certaines conférant une résistance à une seule matière active alors que d'autres confèrent une résistance croisée à différentes matières actives du groupe. La plupart de ces mutations sont situées sur la sous-unité B (H272Y/R/L/V, P225L/T/F/H et N230I), mais la littérature scientifique rapporte également la présence de mutations sur la sous-unité C (H132R et A85V) de la succinate déshydrogénase. Dans le cadre de ce projet, six mutations ont été retrouvées, bien que la présence de trois d'entre elles soit anecdotique (H272V = 0.44%, H272Y = 0.78% et P225H = 0.22%). Les mutations les plus représentées dans le cadre de l'inventaire étaient N230I (51.3%), H272R (24.1%) et P225F (9.4%) (Tableau 2, figures 8a et 8b). La mutation N230I semble être prédominante dans toutes les régions du Québec, sauf en Estrie où la mutation H272R est prédominante.

Les résultats des bioessais ont démontré que les souches sauvages avaient une CI_{50} moyenne de 0.3, 1.2, 0.2 et 0.06 ppm pour le boscalide, le fluopyram, le fluxapyroxad et le pydiflumétofène respectivement. De leur côté, les isolats ayant la mutation H272R avaient des CI_{50} moyennes de 9.2, 0.9, 0.6 et 0.3 ppm pour les quatre mêmes fongicides, tandis que les isolats H272Y avaient des CI_{50} moyennes de 6.2, 1.1, 1.4 et 0.5 ppm. Ainsi, ces deux mutations (H272R et H272Y) confèrent une résistance au boscalide, mais pas nécessairement aux autres fongicides du même groupe. Au contraire, les isolats N230I avaient une CI_{50} moyenne de 15.6, 10.1, 13.6 et 0.7 ppm pour le boscalide, le fluopyram, le fluxapyroxad et le pydiflumétofène respectivement. Les CI_{50} observées pour les isolats N230I sont environ 10 fois plus élevées que pour les génotypes sauvages. Cette mutation semble donc conférer une résistance aux quatre ingrédients actifs testés. Enfin, les isolats ayant la mutation P225F avaient une CI_{50} moyenne de 43.2, 27.4, 72.1 et 0.9 ppm pour le boscalide, le fluopyram, le fluxapyroxad et le pydiflumétofène respectivement. Cette mutation semble donc elle aussi conférer une résistance aux quatre fongicides testés (Figure 5).

Tableau 3. Sensibilité des isolats de *B. cinerea* portant les différentes mutations sur la sous-unité b du gène *sdh* qui confèrent de la résistance aux SDHs en termes de plages de valeurs de CI₅₀ (ppm) et de facteurs de résistance (FR)

| Mutation | Fongicides | | | | | | | |
|----------|------------------|------------|------------------|----------|------------------|-----------|------------------|----------|
| | Boscalide | | Fluopyram | | Fluxapyroxad | | Pydiflumétofène | |
| | CI ₅₀ | FR | CI ₅₀ | FR | CI ₅₀ | FR | CI ₅₀ | FR |
| Sensible | 0.04-0.21 | s.o. | 0.004-0.56 | s.o. | 0.003-0.47 | s.o. | 0.01-0.14 | s.o. |
| H272R | 1.06-15.85 | 8.48-126.8 | 0.06-1.71 | 0.2-6.1 | 0.04-0.72 | 0.2-3.0 | 0.05-1.38 | 0.7-18.4 |
| H272V | 2.40- >50 | 19.2->400 | 1.61-4.36 | 5.7-15.5 | 0.50-1.29 | 2.1-5.4 | 0.43-0.58 | 5.7-7.7 |
| H272Y | 1.30-3.07 | 10.4-245.6 | 0.02-0.06 | 0.1-0.2 | 0.23-0.88 | 1.0-3.7 | 0.21-1.42 | 2.8-18.9 |
| N230I | 0.82-8.97 | 6.6-71.8 | 1.13-10.66 | 4.0-37.8 | 0.16-1.56 | 0.7-6.6 | 0.15-4.82 | 2.0-64.3 |
| P225F | 3.76-43.30 | 30.1-346.4 | 1.09-20.00 | 3.9-70.9 | 3.62- >50 | 15.3->211 | 0.26-1.70 | 3.5-22.7 |

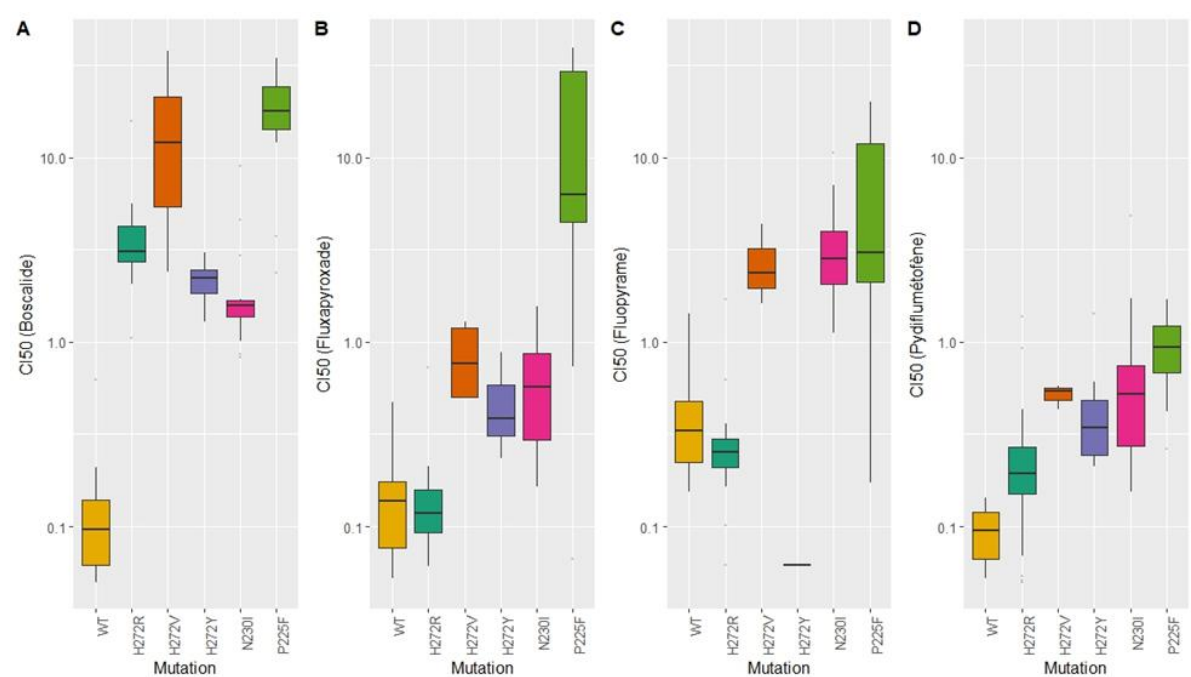


Figure 5: Sensibilité des isolats de *Botrytis cinerea* isolés en 2019-2021 de la fraise et de la vigne confondus possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières actives du groupe 7. Les valeurs de CI₅₀ sont en ppm. Toutes les mutations ont été retrouvées sur la sous-unité B de la succinate déshydrogénase.

Des patrons de résistance croisés existent également pour les matières actives du groupe 7. Cependant, ceux-ci ne sont pas clairs lorsque les analyses de régression sont réalisées avec tous les génotypes. En effet, lorsque les génotypes H272R/V/Y sont inclus, les coefficients de détermination sont faibles pour toutes les paires ($R^2 = 0.29, 0.56, 0.31, 0.57, 0.18$ et 0.51 pour les paires boscalide-fluopyram, boscalide-fluxapyroxad, fluopyram-2023

fluxapyroxad, pydiflumétofène-boscalide, pydiflumétofène-fluopyram et pydiflumétofène-fluxapyroxad respectivement) (Figure 6). Cependant, lorsque l'on réalise les mêmes analyses sans les génotypes H272R/V/Y, on constate que les patrons de résistance croisée sont plus forts ($R^2 = 0.62, 0.79, 0.37, 0.69, 0.40, 0.55$ pour les paires boscalide-fluopyram, boscalide-fluxapyroxad, fluopyram-fluxapyroxad, pydiflumétofène-boscalide, pydiflumétofène-fluopyram et pydiflumétofène-fluxapyroxad respectivement) (Figure 7).

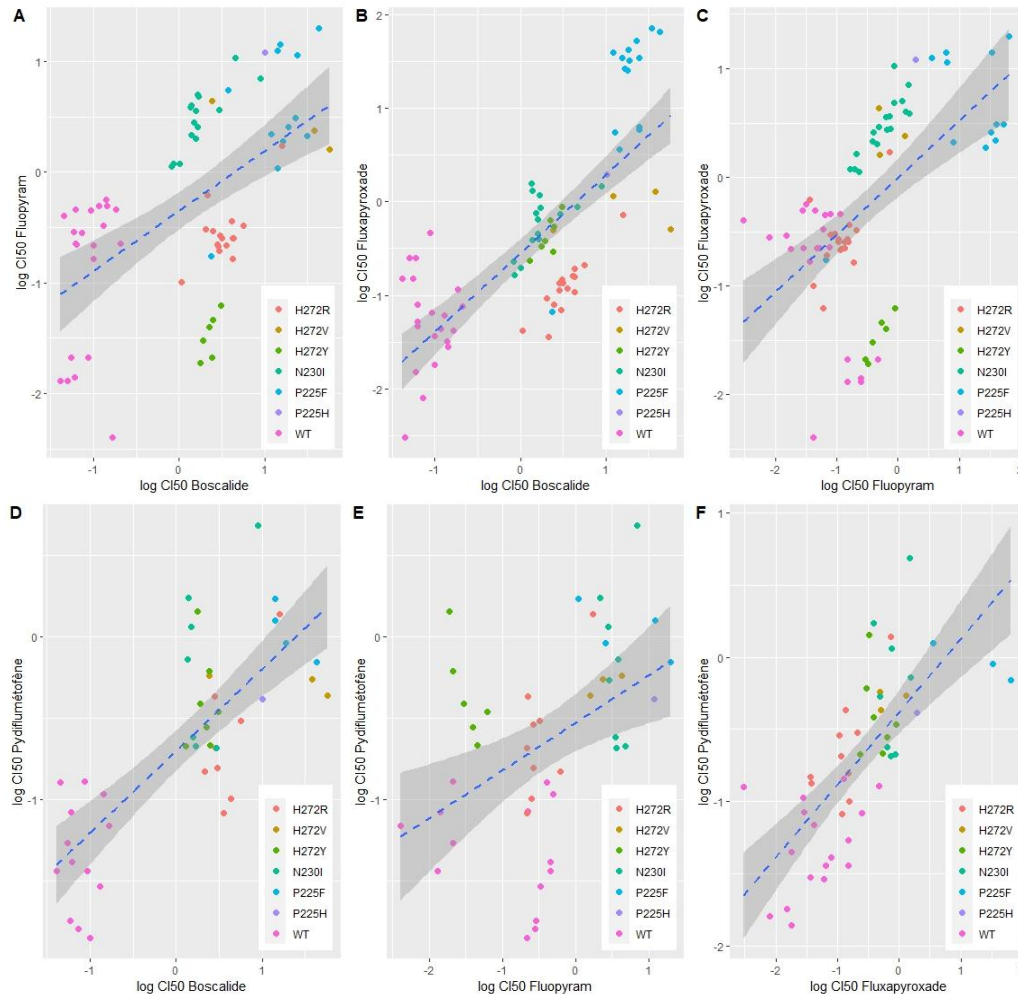


Figure 6: Patrons de résistance croisée observés sur les souches isolées de la fraise et de la vigne confondues et ce par paire pour quatre fongicides du groupe 7 : A) boscalide-fluopyram, B) boscalide-fluxapyroxad, C) fluopyram-fluxapyroxad, D) pydiflumétofène-boscalide, E) pydiflumétofène-fluopyram et F) pydiflumétofène-fluxapyroxad.

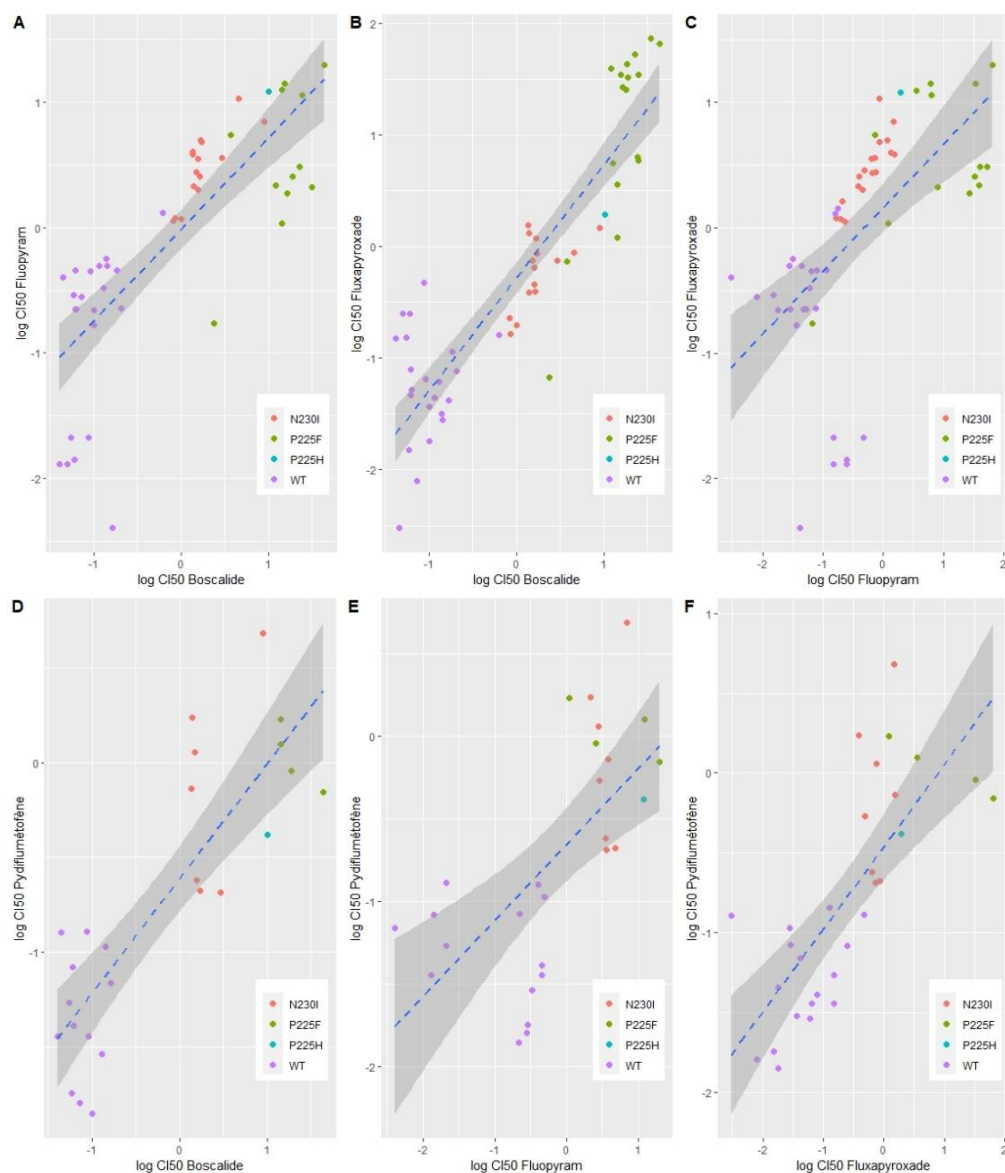


Figure 7: Patrons de résistance croisée observés sur les souches isolées de la fraise et de la vigne confondues et ce par paire pour trois fongicides du groupe 7 : A) boscalide-fluopyram, B) boscalide-fluxapyroxad, C) fluopyram-fluxapyroxad, D) pydiflumétofène-boscalide, E) pydiflumétofène-fluopyram et F) pydiflumétofène-fluxapyroxad. Les analyses de régression ont été faites sans les génotypes H272/R/V/Y.

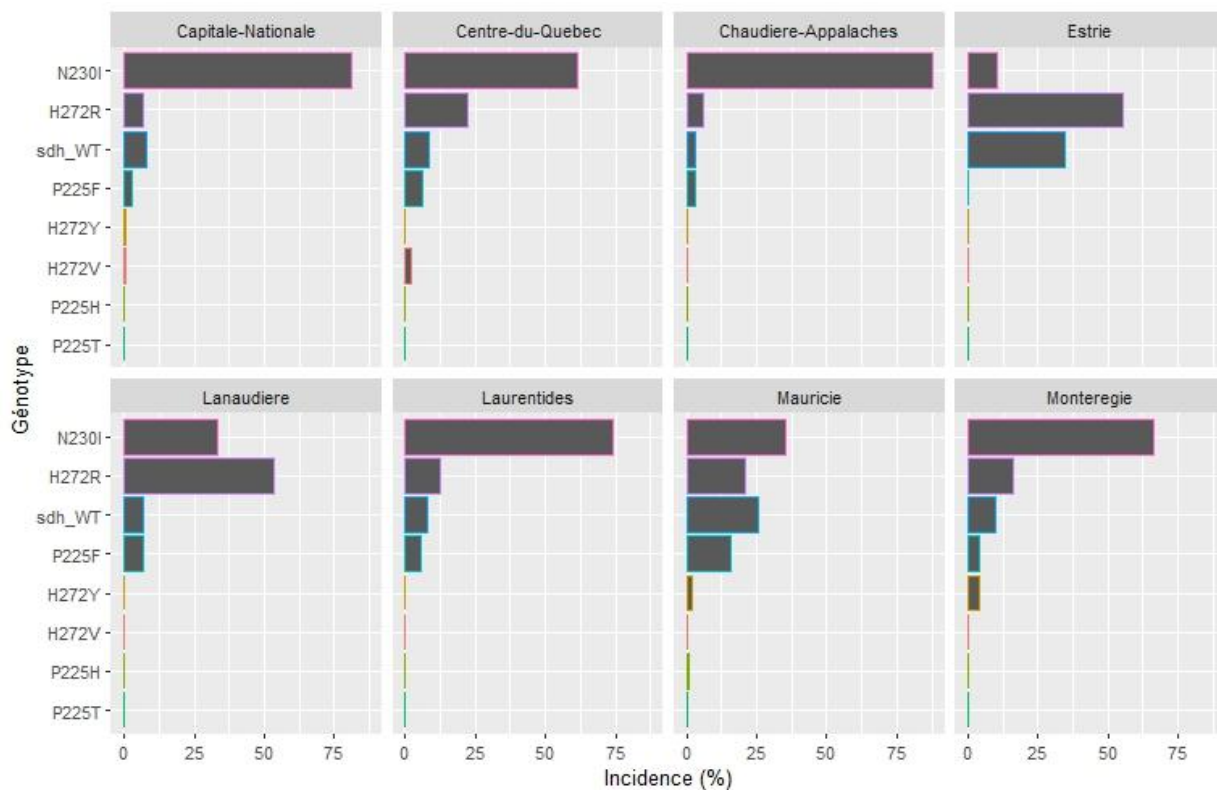


Figure 8a: Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 7 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolés de la fraise pour chaque région échantillonnée.

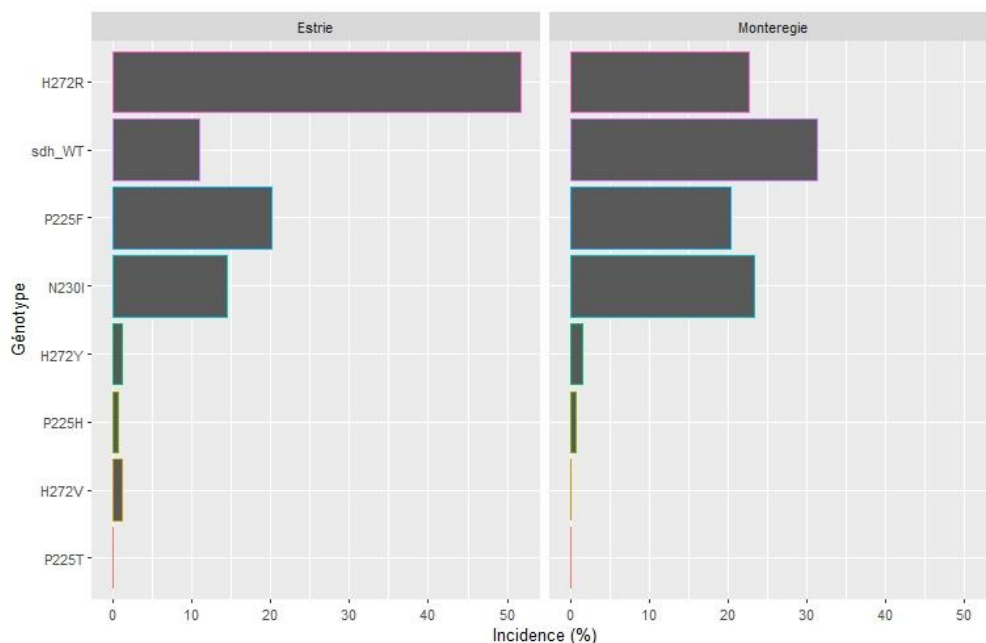


Figure 8b: Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 7 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée.

1.3 Les dicaboximides

Pour la fraise et la vigne, il n'y a plus de produits du groupe 2 d'homologués, ROVRAL contenant de l'iprodione était autrefois utilisé d'où l'intérêt de vérifier la résistance des souches à cette matière active. La résistance à l'iprodione est associée à des mutations présentes sur le gène *Os-1*, codant pour une histidine kinase. On rapporte quatre mutations, soit : I365S/N, Q369H et la double mutation Q369P – N373S. Trois d'entre elles ont été retrouvées dans le cadre de ce projet (Q369P-N373S (7%), I365S (17%) et I365N (51%)) (Tableau 2). De façon générale, la mutation I365N est prédominante dans la plupart des régions sauf en Estrie et en Mauricie où c'est le génotype sauvage qui est prédominant (Figures 10a et 10b). Dans le cas du groupe 2, les isolats n'ayant aucune mutation avaient une CI_{50} moyenne de 5.4 ppm, tandis que les isolats ayant les mutations Q369P-N373S, I365S et I365N avaient une CI_{50} moyenne de 16.4, 19.4 et 27.1 ppm, respectivement.

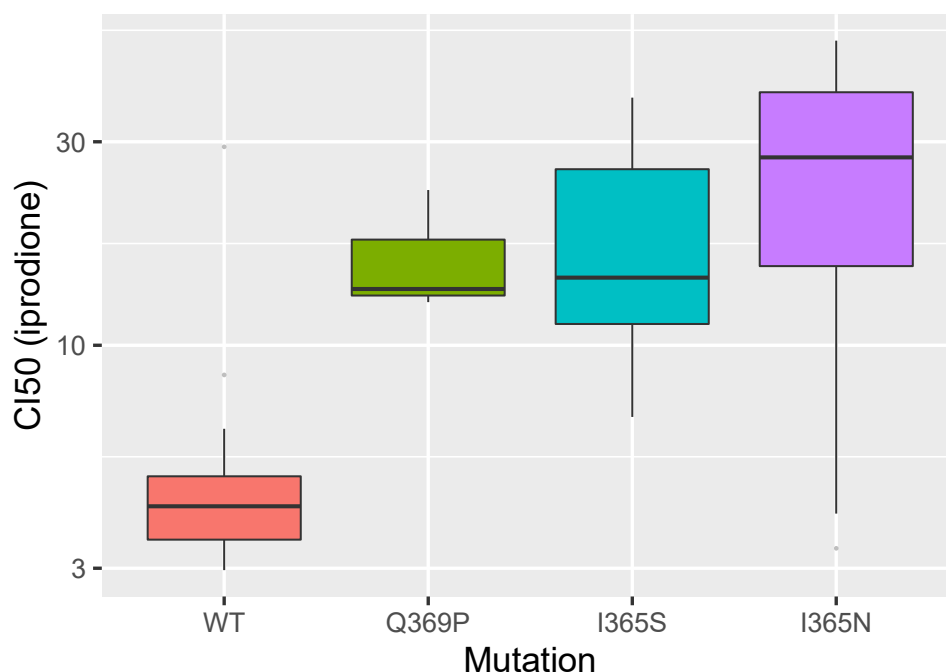


Figure 9 : Sensibilité des isolats de *Botrytis cinerea* isolés en 2019-2021 de la fraise et de la vigne confondus possédant ou non les principales mutations conférant une résistance à l'iprodione (groupe 2) Les valeurs de CI_{50} sont en ppm.

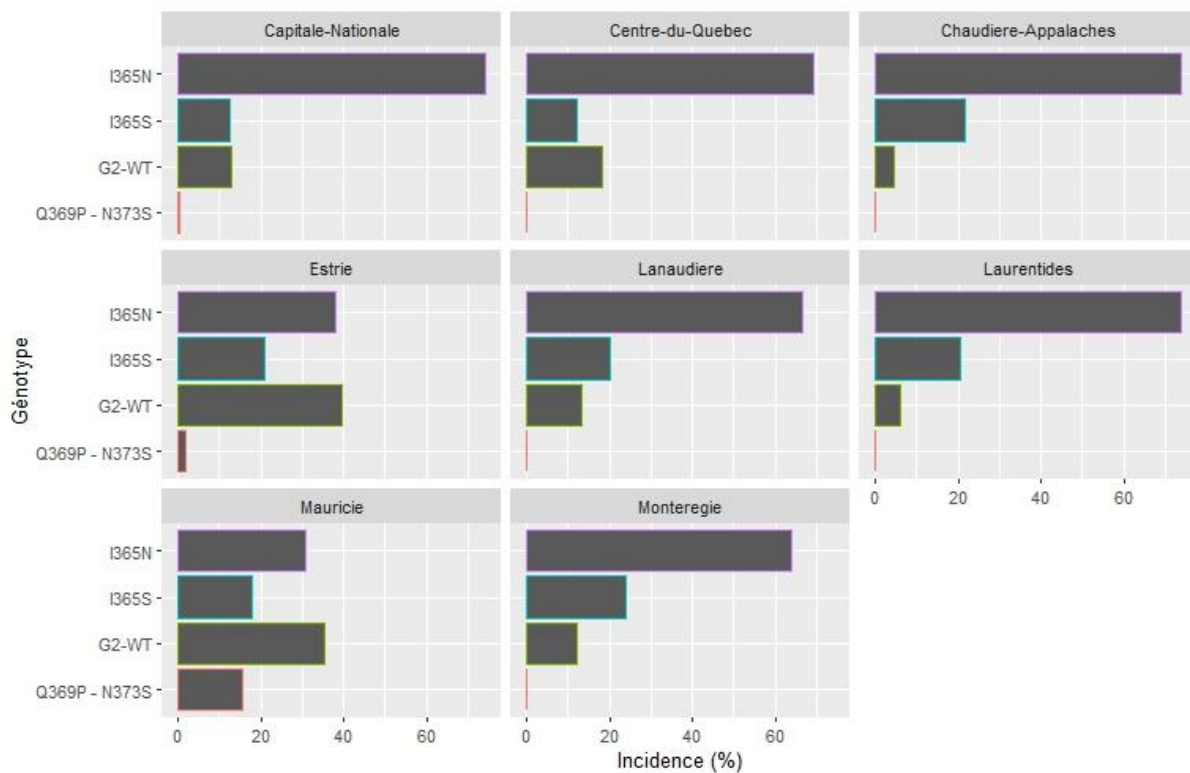


Figure 10a : Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 2 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée.

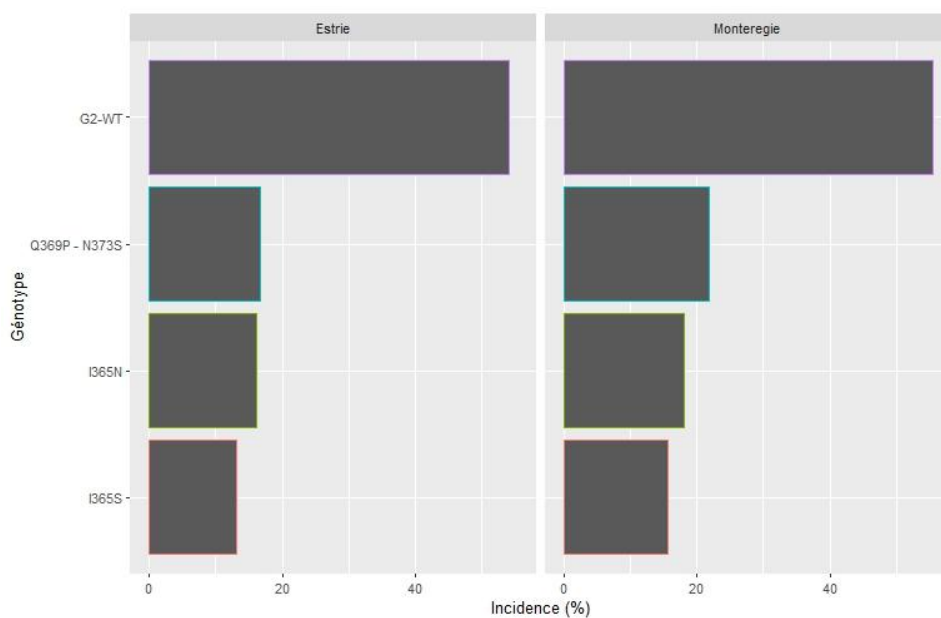


Figure 10b : Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 2 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée.

1.4 Les inhibiteurs de la k to réductase

Le groupe 17 comprend principalement l'ingrédient actif et le produit suivant homologué pour la fraise et la vigne : fenhexamide (ex : ELEVATE). La résistance au fenhexamide (groupe 17) peut être associée à six mutations différentes au sein du gène *erg27*, qui code pour la 3-c tor ductase, causant une substitution aux positions 63 (T63I), 412 (F412I/S/V/C) et 496 (T496R). Dans le cadre de ce projet, quatre de ces mutations ont été retrouvées : F412I (4.9%), F412S (33.1%), F412C (0.1%) et F412V (5.1%) (Figure 11). La mutation la plus représentée dans le cadre de l'inventaire était la F412S, le génotype sauvage était toutefois prédominant en Estrie, dans le Centre-du-Québec, en Mauricie et en Montérégie (Figures 12a et 12b). Pour le fenhexamid, les souches n'ayant aucune mutation avaient une CI_{50} moyenne de 0.75 ppm, tandis que les isolats ayant les mutations F412C, F412I, F412S et F412V avaient des CI_{50} moyennes de 13.9, 47.5, 19.3 et 19.6 ppm, respectivement (Figure 11).

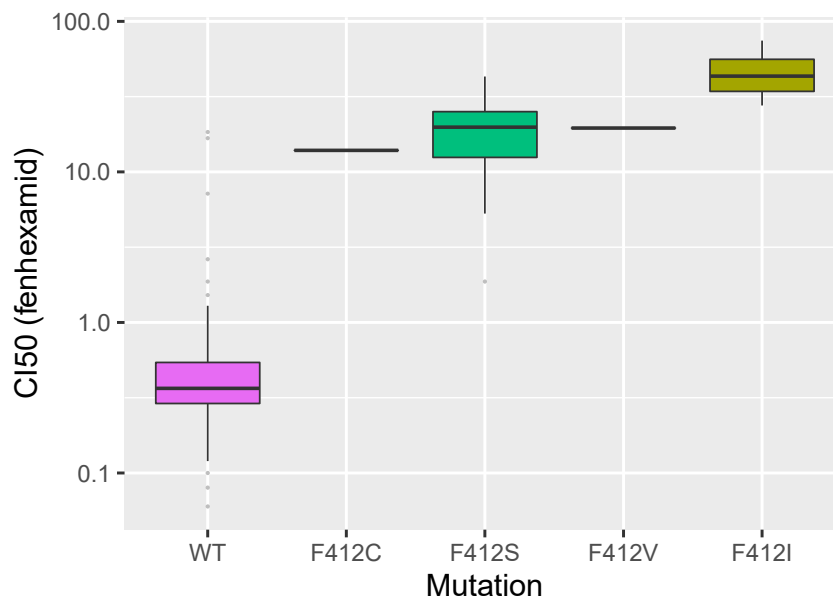


Figure 11 : Sensibilité des isolats 2029-2021 de *B. cinerea* isolés de la fraise et de la vigne confondue possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières actives du groupe 17. Les valeurs de CI_{50} sont en ppm.

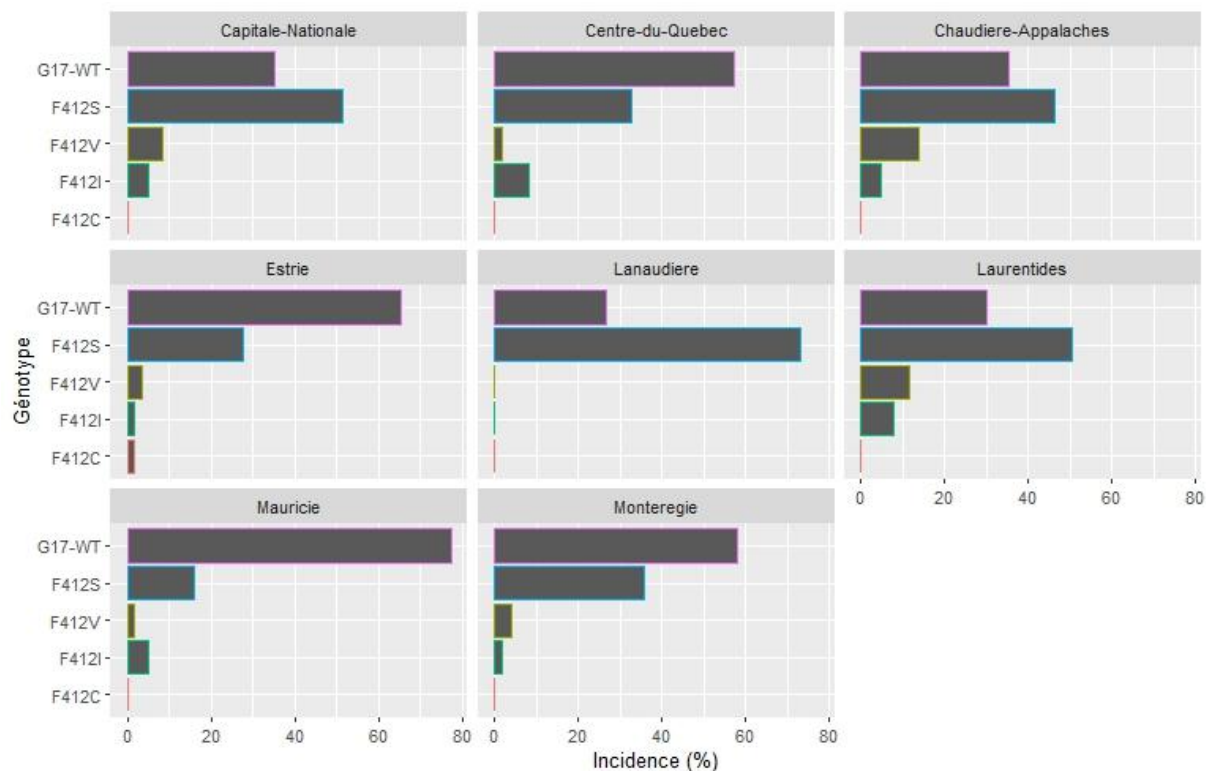


Figure 12a: Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 17 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée.

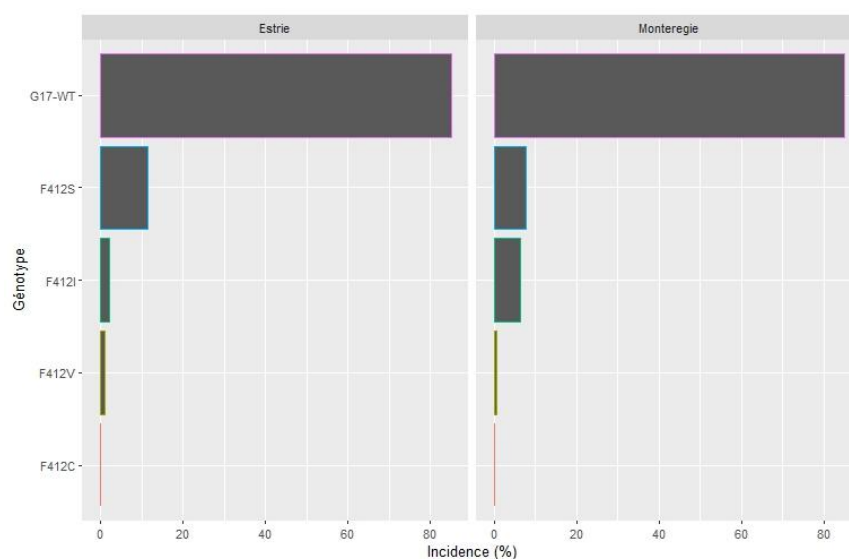


Figure 12b: Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 17 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée.

1.5 les anilinopyrimidines et les phénylpyrrols

Les groupes 9 et 12 sont composés des ingrédients actifs homologués pour la fraise et la vigne: pyriméthanil (9) et fludioxonil (12) (SCHOLAR). Ces ingrédients actifs entrent également dans la composition des produits en mélange suivants : cyprodinil (9) + groupe 3 (INSPIRE SUPER), pyriméthanil (9) + groupe 7 (LUNA TRANQUILITY), cyprodinil (9) + fludioxonil (12) (SWITCH). Les mêmes matières actives ont été testées à la fois pour les souches isolées de la fraise et de la vigne.

Dans le cadre du présent inventaire, les niveaux de résistance aux anilinopyrimidines (groupe 9 : cyprodinile et pyriméthanile) variaient entre 23% et 71% en fonction des régions et des cultures (moyenne de 49%). Basé sur Fernandez-Ortuño et al. 2014, il a été déterminé que les souches étaient considérées résistantes lorsqu'il y avait croissance à la dose discriminante de 4 ppm.

Pour le cyprodinile, les CI_{50} obtenues lors des bio essais de germination de spores variaient de 0.3 à >50 ppm (moyenne 22.6 ppm) dans la fraise conventionnelle (variétés non remontantes), de 0.9 à >50 ppm (moyenne 17.8 ppm) pour la fraise à jours neutres (variétés remontantes) et de 0.4 à >50 ppm (moyenne 12.1 ppm) pour la vigne (Figure 15).

Pour le pyriméthanile, les CI_{50} variaient de 0.4 à >50 ppm (moyenne 8.2 ppm) dans la fraise conventionnelle, de 0.5 à 25.2 ppm (moyenne 8.7 ppm) pour la fraise à jours neutres et de 0.4 à >50 ppm (moyenne 6.3 ppm) pour la vigne (Figure 14).

Les niveaux de résistance observés pour les phénylpyrroles (groupe 12, fludioxonile) étaient pour leur part très bas. Elles variaient entre 0 et 12% (moyenne 4%) dépendamment des régions (Figure 13a, 13b). La dose permettant de séparer les souches résistantes des souches sensibles a été établie à 0.5 ppm et ce toujours selon les doses discriminantes établies par Fernandez-Ortuño et al. 2014. Pour le fludioxonile, les CI_{50} variaient de 0.04 à 40.3 ppm (moyenne 1.2 ppm) dans la fraise conventionnelle, de 0.04 à 11.3 ppm (moyenne 0.6 ppm) pour la fraise à jours neutres et de 0.03 à 9.5 ppm (moyenne 0.3 ppm) pour la vigne (Figure 16).

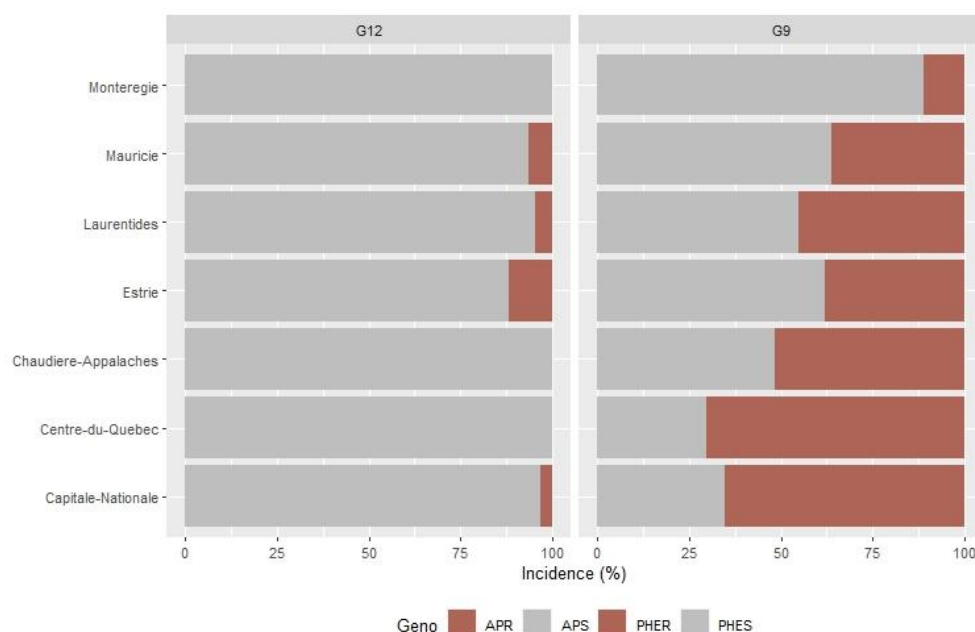


Figure 13a: Résultats des bioessais de germination de spores effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée pour leur résistance aux anilinopyrimidines (G9) (APR : pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, APS : pourcentage de souches présentant un phénotype sensible et aux phénylpyrroles (G12) (PHER : pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, PHES : pourcentage de souches présentant un phénotype sensible).

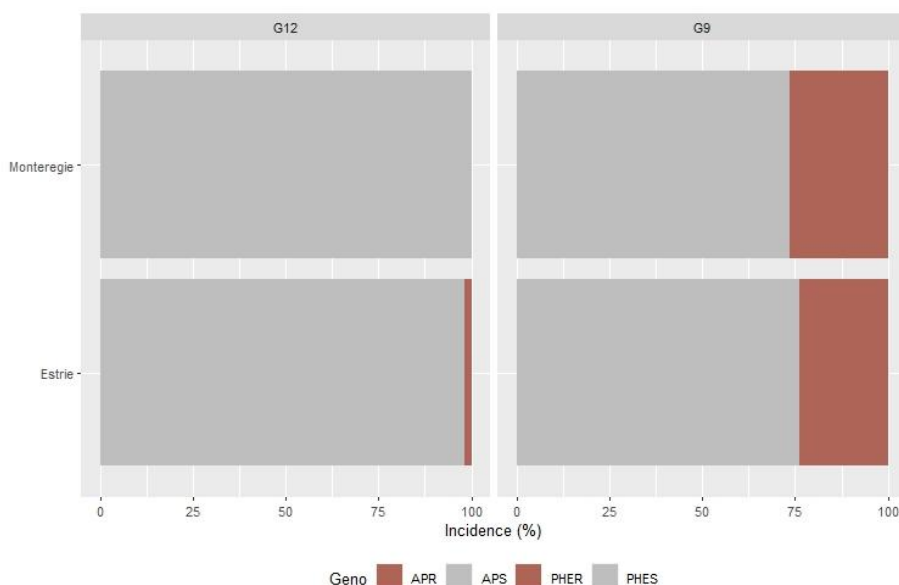


Figure 13b: Résultats des bioessais de germination de spores effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée pour leur résistance aux anilinopyrimidines (G9) (APR : pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, APS : pourcentage de souches présentant un phénotype sensible et aux phénylpyrroles (G12) (PHER : pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, PHES : pourcentage de souches présentant un phénotype sensible).

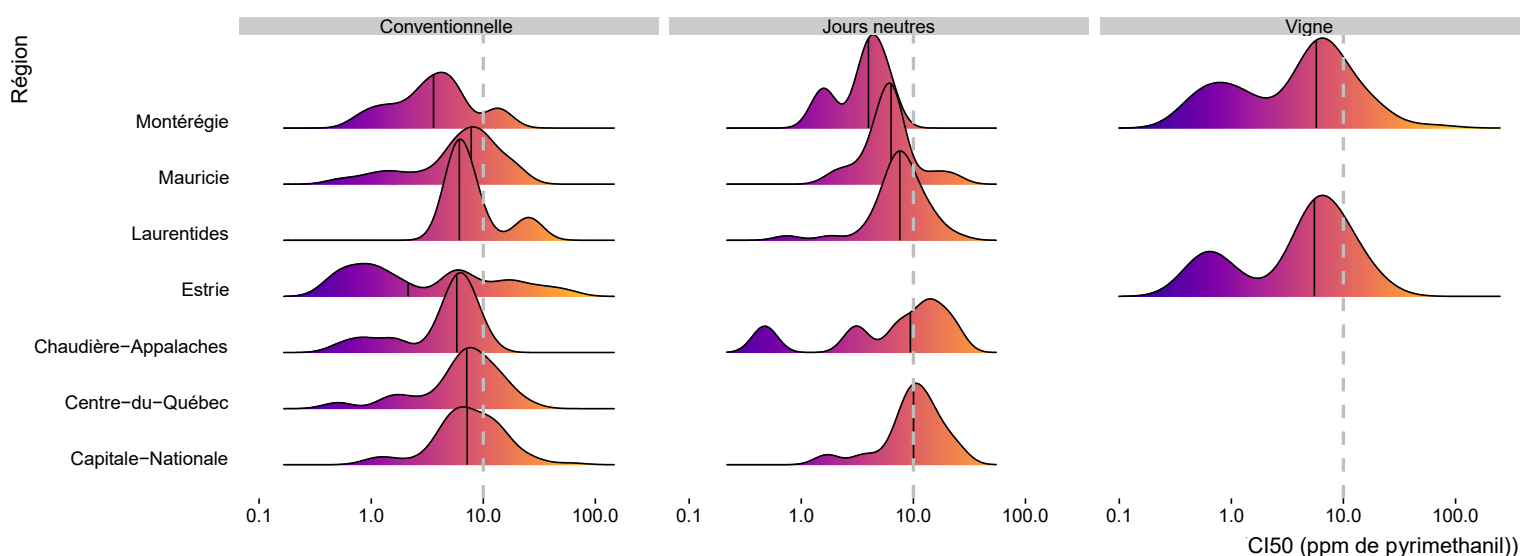


Figure14: Distribution des CI_{50} pour *B. cinerea* au pyriméthanol pour chacune des régions et pour la fraise conventionnelle, la fraise à jours neutres et la vigne. L'axe des x représente les CI_{50} alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de CI_{50}

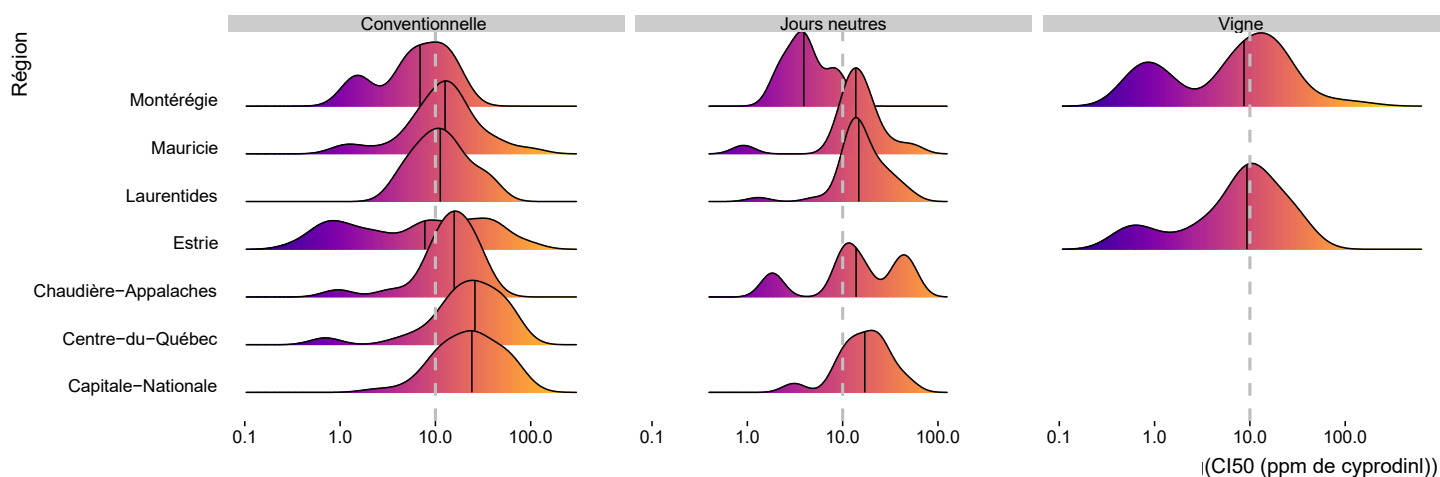


Figure 15: Distribution des CI_{50} pour *B. cinerea* au cyprodinil pour chacune des régions et pour la fraise conventionnelle, la fraise à jours neutres et la vigne. L'axe des x représente les CI_{50} alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de CI_{50} . Théoriquement, la résistance aux groupes 9 et 12 est associée à des mutations sur le facteur de transcription *mrr1*, qui conduit à une surexpression du transporteur *atrB*. Dans ce cas, la cible n'est pas modifiée, mais lorsque *atrB* est surexprimé, il y a une augmentation de l'activité des pompes à efflux et donc un déplacement accru du fongicide vers l'extérieur de la cellule. Il a également été proposé que les mutations sur le gène *Os-1* associées à la résistance au groupe 2 pourraient également conférer une certaine résistance aux groupes 9 et 12.

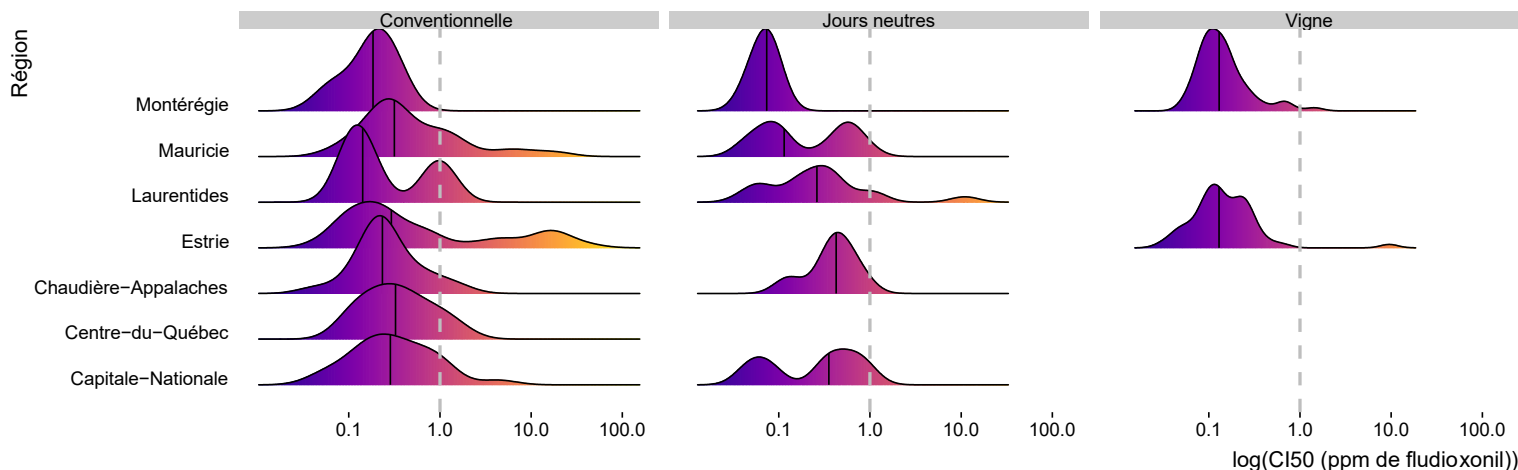


Figure 16: Distribution des CI_{50} pour *B. cinerea* au fludioxonile pour chacune des régions et pour la fraise conventionnelle, la fraise à jours neutres et la vigne. L'axe des x représente les CI_{50} alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de CI_{50} .

Les résultats de séquençage de la région *mrr1* ont permis d'identifier la présence d'un indel de 21 pb spécifique à *B. cinerea* groupe S, soit un nouveau clade génétiquement proche de *B. cinerea* (Leroch et al. 2013. Au total, 9.9% des isolats de la collection possédaient cet indel. Cependant, aucune mutation associée à la surexpression de *atrB* n'a été retrouvée jusqu'à présent. Par ailleurs, bien qu'en moyenne les CI_{50} observées pour le pyriméthanile et le cyprodinile soient plus élevées pour les isolats possédant une mutation du gène *Os-1* par rapport aux phénotypes sauvages (Figure 17), la relation entre la CI_{50} des fongicides du groupe 9 et les mutations Q369P-N373S, I365S ou I365N n'est pas significative. Il existe toutefois un patron de résistance croisé significatif entre le cyprodinile et le pyriméthanile (groupe 9) ($R^2 = 0.88$, $P < 0.001$) (Figure 18), ce qui suggère un mécanisme de résistance commun.

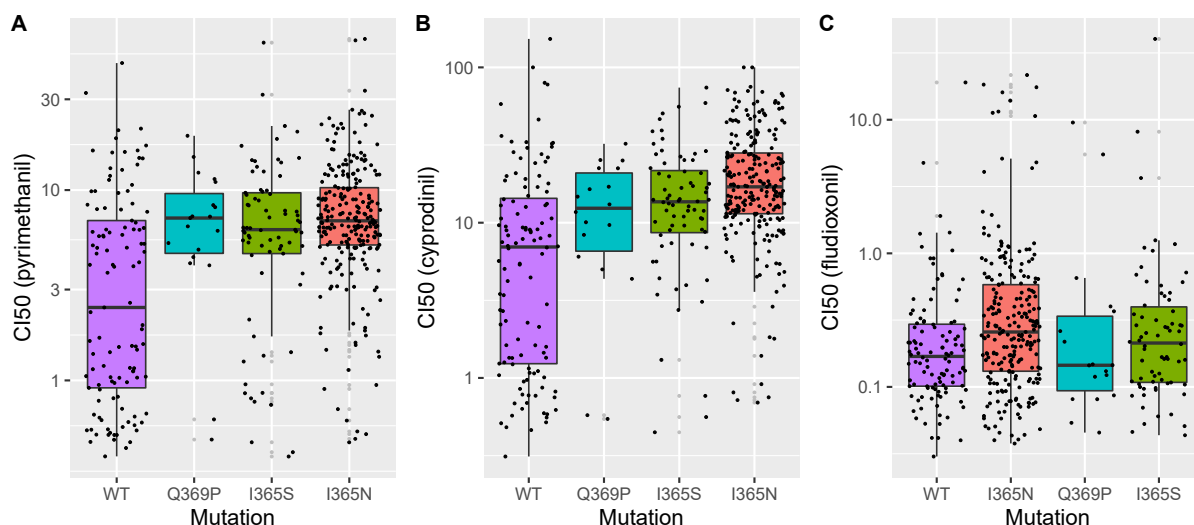


Figure 17: Distribution des CI_{50} pour *B. cinerea* au A) pyriméthanile, B) cyprodinile et C) fludioxonile selon que les isolats possèdent ou non les principales mutations conférant une résistance à l'iprodione (groupe 2). Les valeurs de CI_{50} sont en ppm.

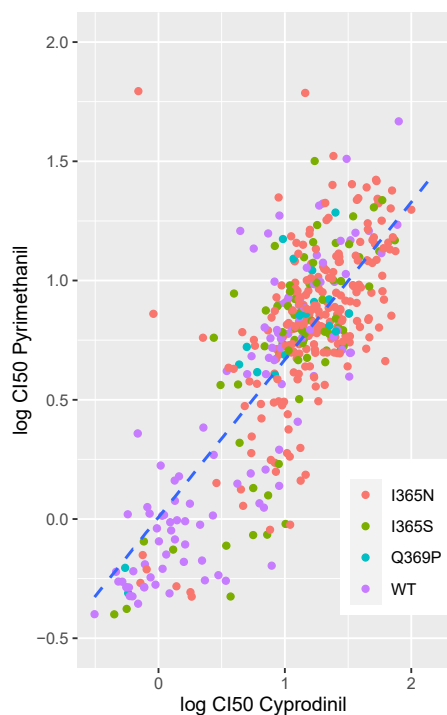


Figure 18: Patrons de résistance croisée observés entre le cyprodinile et le pyriméthanile. Les points de couleur indiquent le génotype des isolats pour le gène *Os-1* associé à la résistance au groupe 2 et potentiellement impliqué dans la résistance aux groupes 9 et 12.

1.6 les profils de résistance multiples

Le suivi de la résistance de *B. cinerea* aux fongicides dans la fraise à jours neutres, la fraise conventionnelle (fraise d'été) et la vigne a permis de dégager plus de 30 profils génétiques de résistance multiple (PGRM), soit des profils où on retrouve chez les isolats des combinaisons de mutations conférant de la résistance à plusieurs fongicides. Cependant, les cinq profils PGRM les plus importants représentent 71% des isolats échantillonnés. Le profil PGRM1 (29.8%) était le plus abondant (résistant aux strobilurines, au fenhexamid, aux dicarboximides et aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase), le PGRM2 (résistant aux strobilurines aux dicarboximides et aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase) était présent chez 19,0% des isolats, alors que le PGRM3 résistant aux strobilurines, aux dicarboximides et au boscalid) et le PGRM4 (sensible à tous les groupes) étaient présents chez 8.8 et 6.8% des isolats, respectivement (Tableau 1).

La distribution des PGRM varie largement d'une région à l'autre. Par exemple, le PGRM1 est présent chez 64.6%, 54.9% et 53.5% des isolats recueillis dans les régions de Chaudière-Appalaches, Laurentides et de la Capitale nationale, respectivement. En revanche, il est présent chez 39.1%, 24.5%, 10.1% et 2.16% des isolats recueillis en Mauricie, dans le Centre-du-Québec, en Montérégie et en Estrie, respectivement (Tableau 1). La distribution des PGRM varie également beaucoup d'une culture à l'autre. Dans la fraise à jours neutres, les PGRM1 et 2 représentent plus de 84% des isolats recueillis tandis que le PGRM 4 (sensible) ne représentait que 0.52% des isolats recueillis (Tableau 2). Dans la fraise conventionnelle, les PGRM1 et 2 représentent un peu moins de 60% des isolats recueillis tandis que le PGRM 4 représente 8.3% des isolats recueillis (Tableau 2). Pour la vigne en revanche, ce sont les PGRM 3 et 5 qui sont les plus abondants, mais ces derniers ne représentent que 31.1% des

isolats, alors que le PGRM4 représentait 8.6% des isolats recueillis (Tableau 2). C'est d'ailleurs pour la vigne que les patrons PGRM sont les plus diversifiés. Il sera intéressant d'établir les liens avec les profils d'utilisation des fongicides.

Tableau 4 : Distribution des profils génétiques de résistance aux fongicides en pourcentage à travers les différentes régions échantillonnées.

| <i>Profils de résistance</i> | <i>Capitale-Nationale</i> | <i>Centre-du-Québec</i> | <i>Chaudière-Appalaches</i> | <i>Estrie</i> | <i>Laurentides</i> | <i>Mauricie</i> | <i>Montréal</i> |
|--|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| GPRM1 QoI ^R , SDHI ^{N230I} , Hydro ^R , Dic ^R | 53.47 | 24.49 | 64.62 | 2.16 | 54.90 | 39.13 | 10.11 |
| GPRM2 QoI ^R , SDHI ^{N230I} , Hydro ^S , Dic ^R | 24.26 | 32.65 | 23.08 | 9.91 | 18.63 | 18.84 | 20.22 |
| GPRM3 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^S , Dic ^R | 0.00 | 10.20 | 4.62 | 18.10 | 1.96 | 8.70 | 11.80 |
| GPRM4 QoI ^S , SDHI ^S , Hydro ^S , Dic ^S | 3.47 | 4.08 | 1.54 | 10.78 | 0.98 | 4.35 | 12.36 |
| GPRM5 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^S , Dic ^S | 0.99 | 2.04 | 1.54 | 19.40 | 0.98 | 4.35 | 3.37 |
| GPRM6 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^R , Dic ^R | 5.94 | 6.12 | 0.00 | 9.91 | 9.80 | 8.70 | 2.25 |
| GPRM7 QoI ^R , SDHI ^{P225F} , Hydro ^S , Dic ^R | 0.99 | 0.00 | 1.54 | 4.31 | 2.94 | 5.80 | 13.48 |
| GPRM8 QoI ^R , SDHI ^S , Hydro ^S , Dic ^S | 2.97 | 2.04 | 0.00 | 4.74 | 1.96 | 4.35 | 8.99 |
| GPRM9 QoI ^R , SDHI ^{P225F} , Hydro ^S , Dic ^S | 0.00 | 0.00 | 1.54 | 8.19 | 1.96 | 0.00 | 1.69 |
| GPRM10 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^R , Dic ^S | 0.00 | 4.08 | 0.00 | 4.31 | 0.00 | 0.00 | 3.37 |

Tableau 5 : Distribution des profils génétiques de résistance aux fongicides en pourcentage par culture échantillonnée.

| <i>Profils de résistance</i> | <i>Conventionnelles</i> | <i>Jours neutres</i> | <i>Vignes</i> | <i>Moyenne</i> |
|--|-------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| GPRM1 QoI ^R , SDHI ^{N230I} , Hydro ^R , Dic ^R | 34.96 | 62.30 | 1.66 | 29.84 |
| GPRM2 QoI ^R , SDHI ^{N230I} , Hydro ^S , Dic ^R | 24.36 | 21.99 | 12.91 | 19.15 |
| GPRM3 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^S , Dic ^R | 6.59 | 1.57 | 15.89 | 8.80 |
| GPRM4 QoI ^S , SDHI ^S , Hydro ^S , Dic ^S | 8.31 | 0.52 | 8.61 | 6.79 |
| GPRM5 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^S , Dic ^S | 2.87 | 0.52 | 15.23 | 6.57 |
| GPRM6 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^R , Dic ^R | 8.88 | 2.09 | 2.98 | 6.46 |
| GPRM7 QoI ^R , SDHI ^{P225F} , Hydro ^S , Dic ^R | 1.43 | 3.66 | 10.60 | 4.90 |
| GPRM8 QoI ^R , SDHI ^S , Hydro ^S , Dic ^S | 3.44 | 0.00 | 8.61 | 4.34 |
| GPRM9 QoI ^R , SDHI ^{P225F} , Hydro ^S , Dic ^S | 0.29 | 0.52 | 7.28 | 2.78 |
| GPRM10 QoI ^R , SDHI ^{H272R} , Hydro ^R , Dic ^S | 0.86 | 0.52 | 4.64 | 2.00 |

Résistance chez les agents phytopathogènes de la fraise

1. L'anthracnose de la fraise (*Colletotrichum acutatum*)

1.1 les strobilurines

Les strobilurines (groupe 11) sont composées des ingrédients actifs et produits suivants homologués dans la fraise : pyraclostrobine (CABRIO), fluoxastrobine (EVITO), trifloxystrobine (FLINT), mandestrobine (INTUITY), azoxystrobine (QUADRIIS). Ces ingrédients actifs sont parfois mélangés à d'autres dans la composition des produits suivants : trifloxystrobine + groupe 7 (LUNA SENSATION), pyraclostrobine + groupe 7 (MERIVON, PRISTINE) et azoxystrobine + groupe 3 (QUADRIIS TOP).

Pour *C. acutatum*, la résistance aux strobilurines est majoritairement associée à la mutation G143A, mais on retrouve aussi la mutation F129L, qui est également localisée sur le gène *Cytb*. Comme pour *B. cinerea*, la proportion d'isolats G143A est généralement très élevée. Elle varie de 8.3% à 100% (moyenne = 94.7%) (Figure 19). La proportion d'isolats F129L est moins élevée, elle varie de 0% à 10% (moyenne = 2.1%) (Figure 19). Comme pour *B. cinerea*, les isolats possédant la mutation G143A ont une CI_{50} ~100 fois plus élevée que les isolats du génotype sauvage (Figure 20). Les mutants F129L ont quant à eux une CI_{50} ~10 fois plus élevée que les isolats du génotype sauvage (Figure 20). En moyenne, les isolats du phénotype sauvage avaient une CI_{50} de 0.03 et 0.9 ppm, tandis que les isolats G143A avaient une CI_{50} de 12.5 et >100 ppm et les génotypes F129L avaient en moyenne une CI_{50} de 0.16 et 20.2 ppm pour la pyraclostrobine et le fluoxastrobine, respectivement (Figure 20).

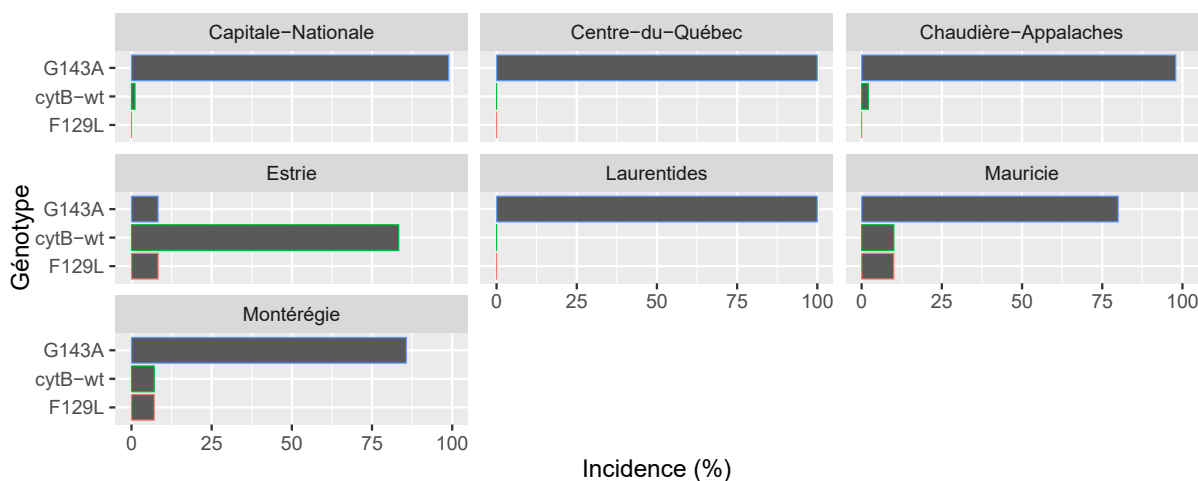


Figure 19: Distribution des génotypes de résistance de *C. acutatum* par région. Les génotypes G143A et F129L sont associés à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que les génotypes G143_wt sont sensibles aux fongicides du groupe.

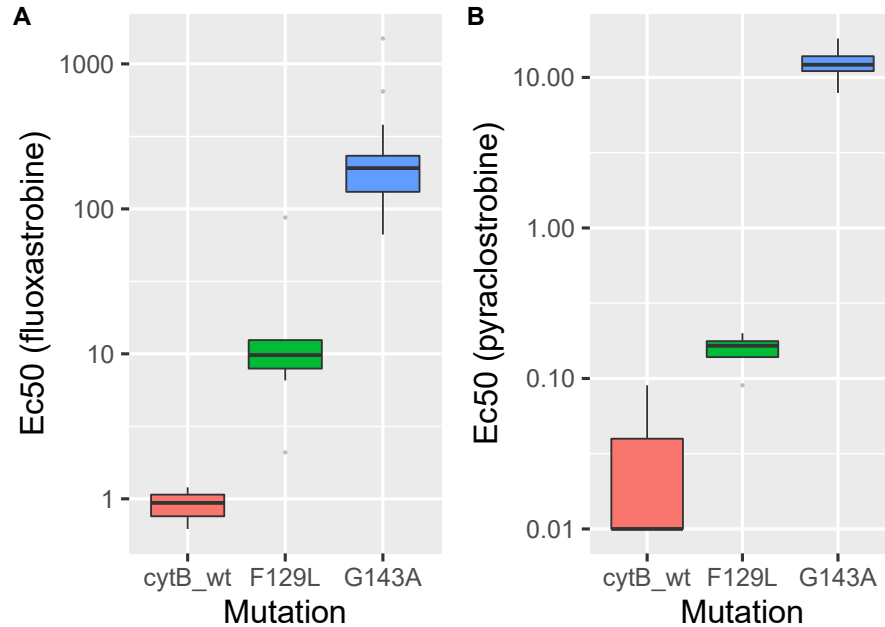


Figure 20 : Sensibilité des isolats de *Colletotrichum acutatum* possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières actives du groupe 11. Les valeurs de CI₅₀ sont en ppm.

Comme pour *B. cinerea*, on observe également des patrons de résistance croisée entre les matières actives du groupe 11. Lorsque l'on compare les CI₅₀ obtenues pour la pyraclostrobine et la fluoxastrobine, on obtient une forte corrélation ($R^2 = 0.91$, $P < 0.001$).

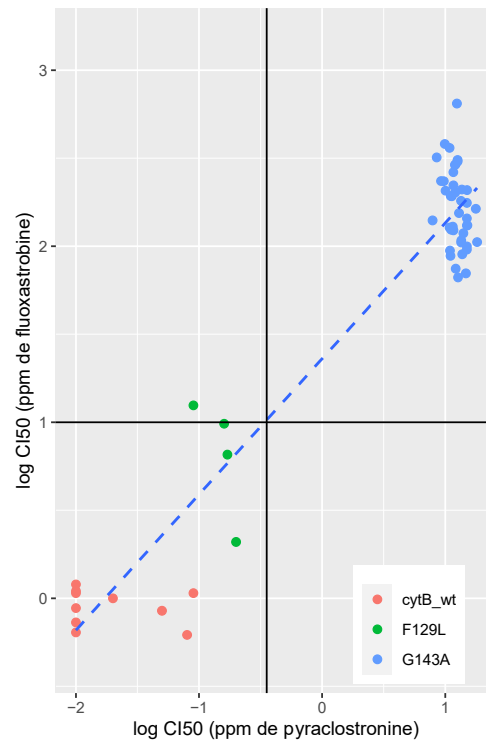


Figure 21: Patrons de résistance croisée observés entre la pyraclostrobine et fluoxastrobine. Les points bleus représentent les isolats ne possédant pas la mutation G143A tandis que les points rouges représentent les isolats possédant cette mutation.

1.2. Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

Contrairement à *B. cinerea*, les fongicides du groupe 7 sont intrinsèquement inefficaces contre les maladies causées par les espèces de *Colletotrichum*, incluant *C. acutatum* (Ishii et al., 2016 ; Liang et al, 2020). Cette tolérance naturelle n'est pas basée sur des mutations dans les gènes codant pour la succinate déshydrogénase (Ishii et al., 2016). C'est d'ailleurs ce que nous observons pour les *C. acutatum* testés dans le cadre de ce projet. Pour le boscalide, le fluxapyroxade et le fluopyrame on n'observe pas d'inhibition aux doses testées (0 – 100 ppm). D'autre part, toutes les souches ont été séquencées pour la sous-unité b de la succinate déshydrogénase, mais aucune mutation liée à la résistance aux fongicides n'a été retrouvée.

Cela étant dit, de récents rapports suggèrent que la matière active du groupe 7 benzovindiflupyre pourrait être efficace pour contrôler *C. acutatum*, mais elle n'est pas homologuée dans la culture (Liang et al, 2020). Le pydiflumétofène, une nouvelle matière active du groupe 7 récemment homologuée dans la culture pourrait également être testée afin d'en vérifier l'efficacité. Cette matière active est toutefois très dispendieuse et n'a donc pas pu être testée en bioessais pour *C. acutatum* dans le cadre du présent projet.

1.3 les anilinopyrimidines et les phénylpyrrols

Les groupes 9 et 12 sont composés des ingrédients actifs et produits suivants homologués pour la fraise : pyriméthanil (9) (SCALA, IMPALA) et fludioxonil (12) (SCHOLAR). Ces ingrédients actifs entrent également dans la composition des produits en mélange suivants : cyprodinil (9) + groupe 3 (INSPIRE SUPER), pyriméthanil (9) + groupe 7 (LUNA TRANQUILITY), cyprodinil (9) + groupe 12 (fludioxonil).

Dans le cadre du présent inventaire, les niveaux de résistance au cyprodinil variaient de 21% à 50%, avec une moyenne provinciale de 33.5%. Les CI_{50} étaient en moyenne de 25.9 ppm pour les isolats résistants et de 0.13 ppm pour les isolats sensibles (Figure 22). Pour le fludioxonil, un seul isolat avait une CI_{50} supérieure à 1 ppm et donc considérée comme résistante (Figure 23). Les CI_{50} étaient en moyenne de 0.02 ppm pour les isolats sensibles et le seul isolat résistant avait une CI_{50} >100ppm (Figure 23)

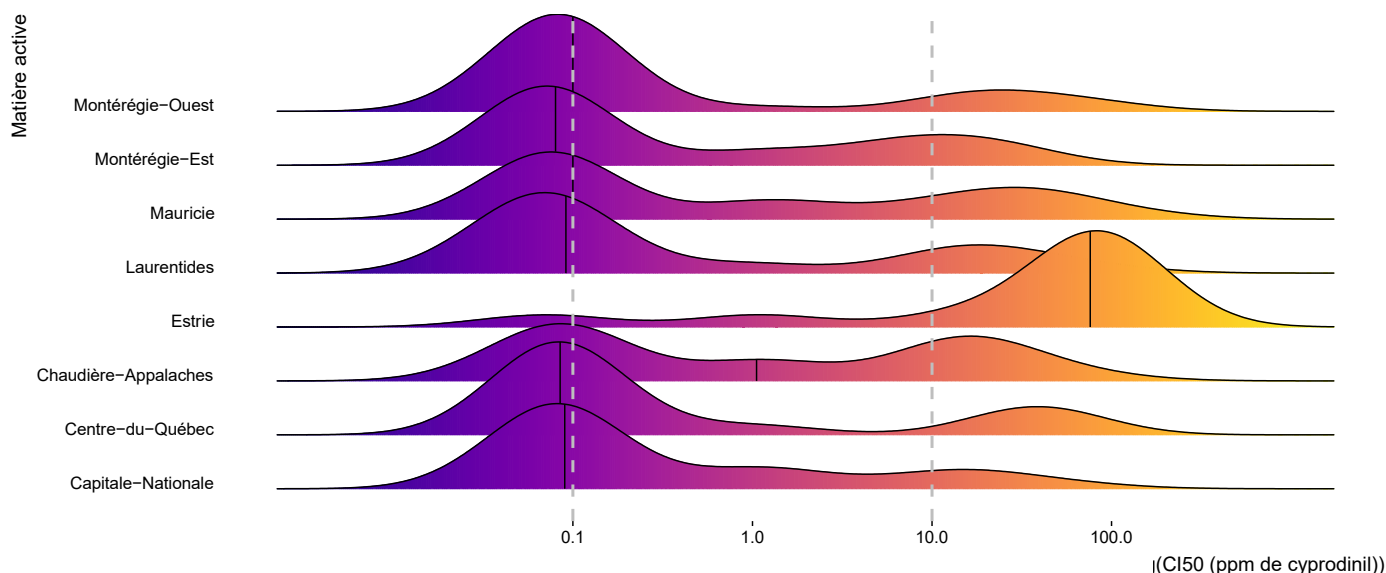


Figure 22: Distribution régionale des CI_{50} pour *C. acutatum* au cyprodinile. L'axe des x représente les CI_{50} alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de CI_{50} .

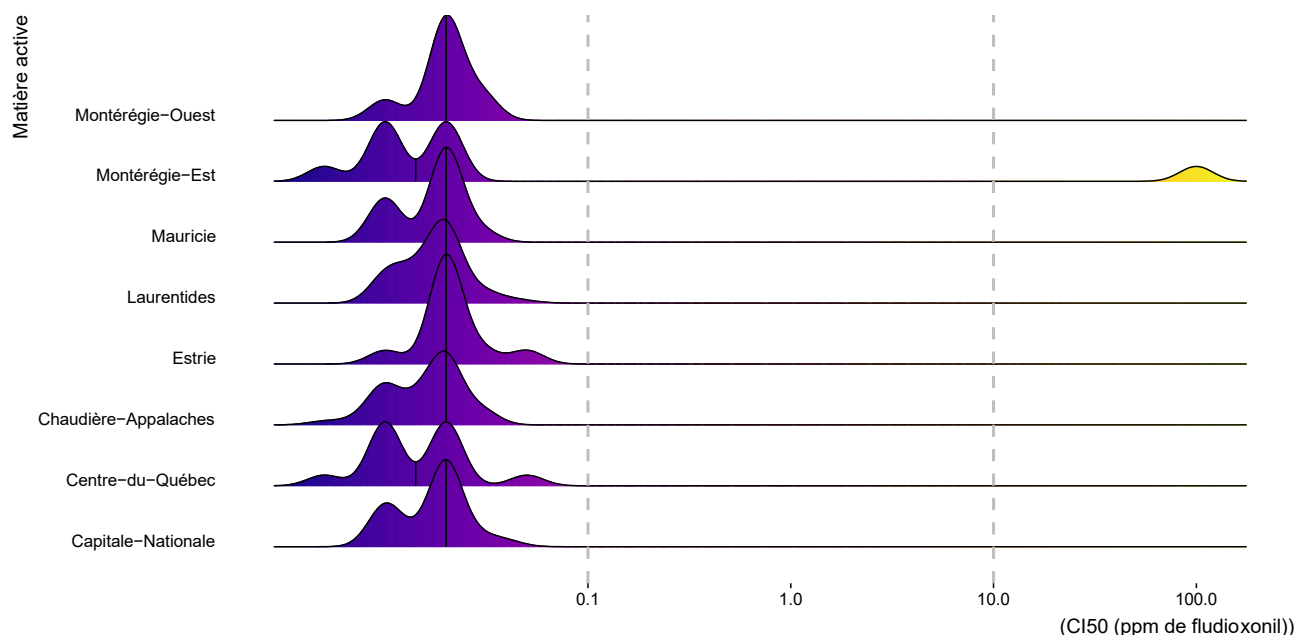


Figure 23: Distribution régionale des CI_{50} pour *C. acutatum* au fludioxonile. L'axe des x représente les CI_{50} alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de CI_{50} .

2. Le blanc de la fraise (*Podosphaera aphanis*)

Il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir de résultats de résistance aux fongicides pour le blanc de la fraise. Très peu d'information est disponible quant à sa génétique, son génome n'a été séquencé que très récemment (Heaven et al. 2023). Aucune séquence de référence n'est disponible pour les principaux gènes et régions géniques impliqués dans la résistance aux fongicides. Malgré le développement de plusieurs amorces de séquençage, il n'a pas été possible d'obtenir des séquences qui nous permettaient de détecter la mutation avec assurance. Une hypothèse qui pourrait expliquer cette difficulté à développer un outil moléculaire simple pour le séquençage de la région génique du cytochrome b est que *P. aphanis* soit hétéroplasmique comme c'est le cas de *Podosphaera xanthii* (Vielba-Fernandez et al. 2018), cette dernière hypothèse reste bien sûr à confirmer. L'hétéroplasmie désigne la coexistence de mitochondries normales et mutées au sein d'une même cellule. Si tel est le cas, un même isolat de *P. aphanis* pourrait posséder à la fois des copies mutantes et des copies normales du *cytb*. La présence de la mutation ne suffit pas à déterminer si la souche est résistante ou non, il faut connaître la proportion des allèles mutés. Un nombre croissant d'allèles possédant la mutation augmente les chances que la souche soit résistante. En effet, dans leur étude, Vielba-Fernandez et al. (2018) ont pu déterminer qu'afin d'avoir un phénotype résistant aux strobilurines, une souche de *P. xanthii* devait détenir au moins 70% d'allèles G143A alors que chez les souches sensibles, l'allèle muté pouvait aussi être présent et la proportion variait de 10 à 60%.

Résistance chez les agents phytopathogènes de la vigne

1. Le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*)

1.1 Les strobilurines

Pour *P. viticola*, la résistance aux strobilurines (groupe 11) est aussi associée à la mutation G143A localisée sur le cytochrome b. Pour ce gène, 227 des 320 isolats ont pu être caractérisés. La proportion des échantillons de la présente étude pour lesquels le génotype est résistant est modérée. Cette proportion varie de 54% en Estrie à 69% en Montérégie (Figure 25).

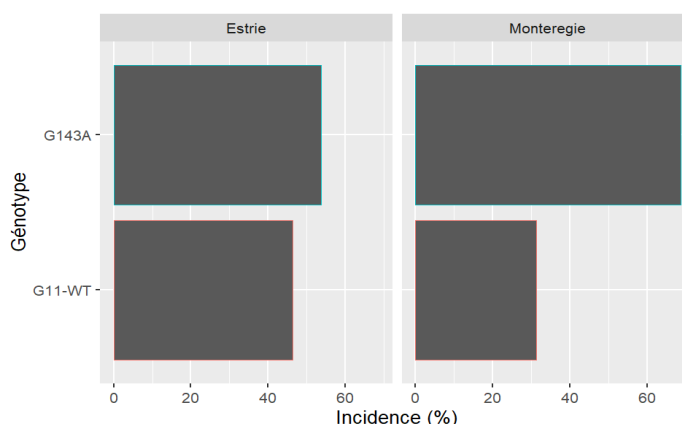


Figure 25: Distribution des génotypes de résistance de *P. viticola* par région. Le génotype G143A est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que le génotype G143-wt est sensible aux fongicides du groupe.

1.2 Les amides de l'acide carboxylique

La résistance aux amides de l'acide carboxylique (groupe 40) est pour sa part causée par la mutation G1105S localisée sur le gène *cesA3*. Pour ce gène, 271 des 320 isolats ont pu être caractérisés. Aucun échantillon de *P. viticola* du présent inventaire ne possédait de mutation à la position 1105 (Figure 26). Toutefois 10,7% de ceux-ci étaient hétérozygotes (HTZ), donc porteurs de la mutation sur un des deux allèles. En Estrie, les hétérozygotes ne représentaient que 0,5% des échantillons prélevés alors qu'en Montérégie il s'agissait plutôt de 33%. Bien que la mutation soit récessive, la présence d'hétérozygotes dans la population démontre un potentiel pour le développement de la résistance aux CAAs.

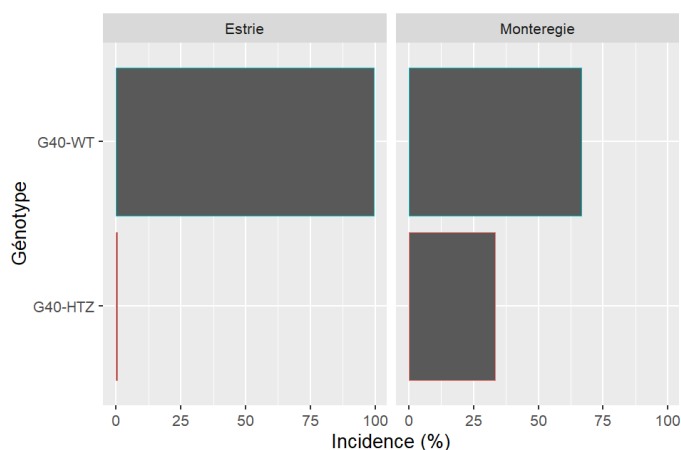


Figure 26: Distribution des géotypes de résistance de *P. viticola* par région. Le géotype G1105S (pas représenté sur le graphique puisqu'il n'a pas été détecté parmi les échantillons traités) est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 40, alors que les géotypes G40-wt et G40-HTZ sont sensibles aux fongicides du groupe.

2. Le blanc de la vigne (*Erysiphe necator*)

1.1 Les strobilurines

Pour *E. necator*, la résistance aux strobilurines (G11) est aussi associée à la mutation G143A localisée sur le cytochrome b. Pour ce gène, 169 des 200 isolats ont pu être caractérisés. La proportion d'échantillons résistants est de 52% en Montérégie et de 83% en Estrie (Figure 27).

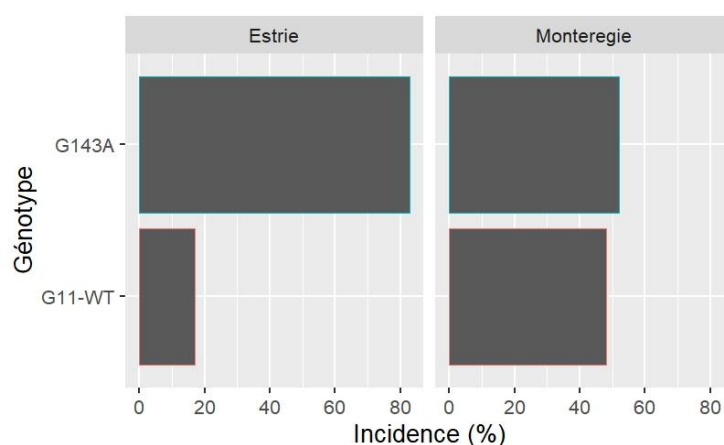


Figure 27: Distribution des géotypes de résistance de *E. necator* par région. Le géotype G143A est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que le géotype G11-wt est sensible aux fongicides du groupe.

1.2. Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

Pour *E. necator*, la résistance aux SDHI (G7) est principalement associée à la mutation H242R localisée sur la sous-unité b du gène *sdh*. Pour ce gène, 156 des 200 isolats ont pu être caractérisés. La proportion des échantillons de la présente étude qui sont résistants varie de 23% en Montérégie à 39% en Estrie (Figure 28).

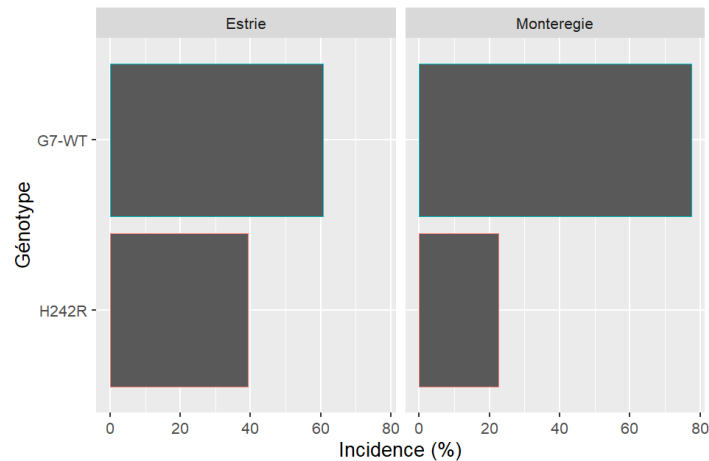


Figure 28: Distribution des génotypes de résistance de *E. necator* par région. Le génotype H242R est associé à une résistance au boscalide, alors que le génotype G7-wt est sensible aux fongicides du groupe.

1.3. Les inhibiteurs de la déméthylation

Pour *E. necator*, la résistance au difénoconazole est principalement associée à la mutation Y136F localisée sur le gène *cyp51*. Le succès d'amplification du fragment nécessaire pour la détection de cette mutation n'était pas très élevé, sur un total de 200 isolats d'*E. necator*, seulement 90 isolats ont pu être caractérisés. La proportion des échantillons de la présente étude qui sont résistants est très variable entre les deux régions échantillonnées. En effet la proportion d'isolats résistants (Y136F) en Estrie est de 60% alors que cette proportion n'est que de 5% en Montérégie. La proportion d'isolats possédant les deux génotypes (G3-HTZ) est toutefois moins variable entre les régions, elle est de 19% en Estrie et de 25% en Montérégie respectivement. (Figure 29).

La mutation A1119C est aussi associée à une forte résistance aux fongicides des inhibiteurs de la déméthylation (Frenkel et al. 2025). Les résultats de séquençage de celle-ci ne sont pas présentés dans le cadre de ce rapport puisque le succès d'amplification du fragment permettant sa détection était très faible et peu de résultats sont disponibles.

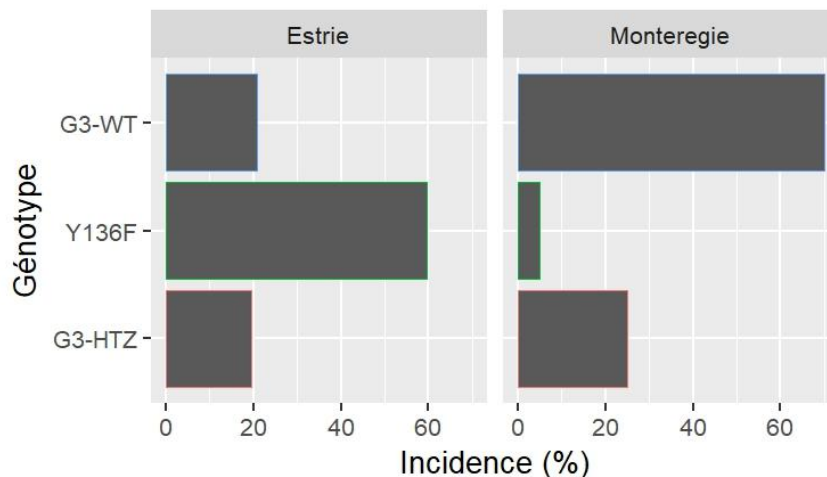


Figure 29: Distribution des génotypes de résistance d'*E. necator* par région. Le génotype Y136F est associé à une résistance aux fongicides du groupe 3, le génotype HTZ porte la mutation récessive sur un des deux allèles du gène, mais est sensible alors que le génotype G3-wt est sensible aux fongicides du groupe.

Résistance chez les agents phytopathogènes de l'oignon

1. *Botrytis squamosa*

La pression exercée sur la culture d'oignon par *B. squamosa* était relativement faible et, bien que 370 échantillons aient été prélevés, la proportion d'échantillons isolés par rapport au nombre d'échantillons affectés était faible. Sur les 370 échantillons prélevés, seulement 215 isolats de *B. squamosa* ont été obtenus (efficacité d'isolation de 58%).

Basée sur un facteur de résistance supérieur à 2, l'incidence de la résistance était de 83% pour le boscalide, avec des CI_{50} variant de 0 à > 100ppm (Tableau 6, Figure 30). Pour le fluopyrame, 78% des isolats étaient résistants et les valeurs de CI_{50} étaient comprises entre 0,01 ppm et 1.59 ppm (moyenne = 0.43 ppm). Pour le fluxapyroxade, les valeurs de CI_{50} étaient comprises entre 0,001 ppm et 4.35 ppm (moyenne = 0.67 ppm) et 79% des isolats étaient considérés résistants. Pour les fongicides du groupe 7, seule la mutation H272Y a été retrouvée sur le gène codant pour la succinate déshydrogénase.

Les valeurs de CI_{50} étaient comprises entre 0.05 ppm et 10.88 ppm (moyenne = 1.19 ppm) pour la picoxystrobine et 76% des souches étaient considérées comme étant résistantes. L'incidence de la résistance pour la pyraclostrobine était de 61% et les valeurs de CI_{50} étaient comprises entre 0.06 ppm et 0.83 ppm (moyenne = 0.39 ppm) (Tableau 7, Figure 30). Contrairement à *B. cinerea* ou à *C. acutatum*, il n'a pas été possible d'amplifier le cytochrome b, où les mutations associées à la résistance au groupe 11 se trouvent.

Le difénoconazole a également été testé dans le cadre de ce projet, l'incidence de la résistance était de 80%, les CI_{50} étaient comprises entre 0.025 ppm et 0.39 ppm (moyenne = 0.18 ppm). Pour le fludioxonil l'incidence de la résistance était de 5%, les valeurs de CI_{50} étaient comprises entre 0.014 ppm et 0.038 ppm (moyenne = 0.026 ppm). Pour le pyriméthanil (groupe 9), les valeurs de CI_{50} étaient comprises entre 0.15 ppm et 15.17 ppm (moyenne = 0.98 ppm) et l'incidence de la résistance était de 39% (Tableau 8, Figure 30).

Tableau 6. Facteurs de résistance des souches testées pour leur sensibilité aux fongicides du groupe FRAC 7

| FR | Boscalide | Fluopyram | Fluxapyroxad |
|-----------|-----------|-----------|--------------|
| | N= 82 | N=88 | N=87 |
| <2 | 17% | 22% | 21% |
| >2 & < 10 | 1% | 70% | 16% |
| > 10 | 82% | 8% | 63% |

Tableau 7. Facteurs de résistance des souches testées pour leur sensibilité aux fongicides du groupe FRAC 11

| FR | Picoxystrobine | Pyraclostrobine |
|-----------|----------------|-----------------|
| | N= 86 | N=87 |
| <2 | 24% | 39% |
| >2 & < 10 | 30% | 60% |
| > 10 | 46% | 1% |

Tableau 8. Facteurs de résistance des souches testées pour leur sensibilité aux fongicides des groupes FRAC 3, 9 et 12

| FR | Difénoconazole | Pyriméthanile | Fludioxonil |
|-----------|----------------|---------------|-------------|
| | N= 87 | N=87 | N=87 |
| <2 | 20% | 61% | 95% |
| >2 & < 10 | 80% | 32% | 5% |
| > 10 | 0% | 7% | 0% |

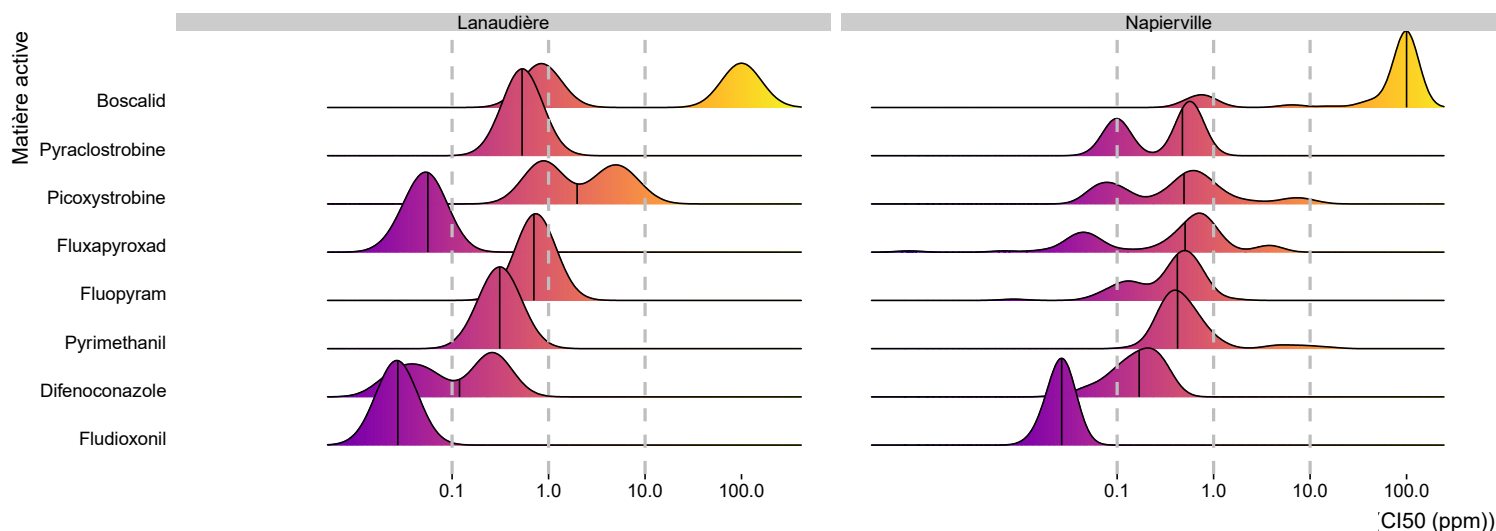


Figure 30: Distribution régionale des CI_{50} pour *B. squamosa* aux différents fongicides testés dans le cadre de ce projet. L'axe des x représente les CI_{50} alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de CI_{50} .

Diffusion, formation et encadrement

Les résultats du projet ont fait l'objet d'une présentation en février 2020 à Drummondville lors de la journée Inpacq horticole. En 2021, les résultats ont également été diffusés à travers les avertissements du réseau d'avertissement phytosanitaire (RAP), dans les fiches techniques sur l'antracnose et la moisissure grise publiées annuellement. Ils ont également fait l'objet d'une chronique dans les Nouvelles fraîches, publiées par l'Association des producteurs de fraises et framboises du Québec. Les résultats ont été présentés en avril 2021 aux conseillers participant au projet. En février 2022, une présentation a été faite aux conseillers de Sollio, pour les sensibiliser aux risques de développement de résistance. En mars 2023, une présentation a été faite lors des rencontres de recherche des RAP petits fruits et RAP vigne. De plus, en juillet 2023, une présentation a été faite lors de la journée de conférence et de partage à la Ferme expérimentale d'Agriculture et Agroalimentaire Canada de Frelighsburg dans le cadre de l'événement " La gestion intégrée des ennemis des cultures " pour les vigneronnes et vignerons du Québec. Un article scientifique est en cours de préparation et nous espérons que les résultats seront publiés d'ici la fin de 2024.

Un autre aspect important du projet touche la formation d'étudiants gradués et au Baccalauréat. Une étudiante à la Maîtrise (Marie Poulin-Ouellette), co-supervisée par Dr Odile Carisse, H. Van der Heyden et K. Bouarab, a travaillé sur la résistance de *B. squamosa* aux fongicides (Annexe 2). De plus, plusieurs stagiaires coop ont été formés au laboratoire soit : Antoine Castonguay (Baccalauréat UdeS), Coralie Godon (Baccalauréat UdeS), Daphnée Sabourin (Baccalauréat UQAM), Émilie Roy (Baccalauréat UdeM), Michel Renaud (Baccalauréat UdeS), Naomi Aubut (Baccalauréat UdeS) et Sarika Beauchemin (Baccalauréat UdeM).

BIBLIOGRAPHIE

Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., and Schnabel, G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. states. *Plant Dis.* 98:825-833.

Frenkel, O., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., and Milgroom, M. G. 2015. Mechanisms of resistance to an azole fungicide in the grapevine powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*. *Phytopathology* 105:370-377.

Stammler, G. et Speakman, J. 2006. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 154, 508-510.

Vielba-Fernández, A., Bellón-Gómez, D., Torés JA, de Vicente A., Pérez-García, A., Fernández-Ortuño, D. 2018. Heteroplasmy for the Cytochrome b Gene in *Podosphaera xanthii* and its Role in Resistance to Qol Fungicides in Spain. *Plant Dis.* Aug;102(8):1599-1605. doi: 10.1094/PDIS-12-17-1987-RE. Epub 2018 Jul 3. PMID: 30673427.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Anne Piuze-Paquet, M.sc

Téléphone : 450-454-3992

Courriel : apiuze@phytodata.ca

Cie de Recherche Phytodata

291 rue de la coopérative

Sherrington, Québec, J0L 2N0

ANNEXES

ANNEXE I : Protocoles de PCR-Séquençage

Tableau 1. Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour les gènes de résistance ciblés

| Espèce | Nom amorce | Séquence (5'-3') | Concentration (mM) | Gène cible | Longueur du fragment (pb) | Programme PCR |
|--------------------------------|------------------|------------------------------|--------------------|------------|---------------------------|---------------|
| <i>Botrytis cinerea</i> | Qoi13extF | GGTATAACCCGACGGGGTTATAGAATAG | 300 | Cytb | 560/2000 | A |
| | Qoi14extR | AACCATCTCCATCCACCATACCTACAAA | 300 | | | |
| | SdhF | AAGGTATCTGCGGCAGTTGT | 300 | Sdhb | 567 | A |
| | SdhR | ATCTCCGCAATTGCCAAACC | 300 | | | |
| | Erg27F | TGTTTCGGAGATCATGCC | 300 | Erg27 | 244 | B |
| | F412Send | ACCAGGAACTTCGGTTCGTA | 300 | | | |
| | BcOS05 | GAGGCTTTCCAAAAAGCTCTAC | 200 | Os-1 | 1030 | C |
| | BcOS10R | TCTTGGTCAAATCTCCTCTGGCGACA | 200 | | | |
| <i>Colletotrichum acutatum</i> | Cgramctyb-bf1 | GAAGAGGTATGTACTACGGTTCATATAG | 300 | Cytb | 500 | A |
| | Cgramctyb-br1 | TAGCAGCTGGAGTTTGCATAG | 300 | | | |
| | KES719_F | CTBCCNCACACCTACGTCGTCAAGGAC | 300 | Sdhb | 414 | A |
| | KES729_R | CTTCTTRATCTCVGCRATVGCC | 300 | | | |
| <i>Erysiphe necator</i> | ENCBF4 | GTATGAACAATAGGTGTTGTAA | 400 | Cytb | 456 | D |
| | ENCBR3 | CATTGGGTTAGCCATAATAT | 400 | | | |
| | SdhB-3F | AGACGAAGCTGTAGAGAGGGT | 300 | Sdhb | 700 | E |
| | SdhB-3R | GCTGGAGAAAAACGCCTTTCAA | 300 | | | |
| | CYP51F-Y136 | TCATCTCTTTTCCAGCCTATC | 200 | Cyp51 | 1700 | F |
| | CYP51R-Y136 | GTATTGAGGCGGGTAAATCG | 200 | | | |
| | ENcyp1055F-A1119 | TTCTGATGGCTGGACAACAC | 300 | Cyp51 | 697 | G |
| | ENcyp1752R-A1119 | AACCCTAACACCTGCCATAAA | 300 | | | |
| <i>Plasmopara viticola</i> | CB279F | TATACATATTTTAGGGGTTTG | 200 | Cytb | 538 | H |
| | StrobiR | CCACTCAGGAACAATATGTAAAGG | 200 | | | |
| | PVcesa3F | GCACAGCAGACATGGTTTTCTT | 250 | CesA3 | 612 | I |
| | PVcesa3R | GTCCAAAAGTGCAAA GTCCAACG | 250 | | | |

Les mélanges réactionnels ont été préparés en utilisant le Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer à concentration finale 1x et en ajoutant du BSA à une concentration finale de 0,2 mg/ml.

À noter que le mélange réactionnel de *E. necator* pour l'amplification du cyp51-Y136F contient aussi du DMSO à une concentration finale de 3 % et que le mélange réactionnel pour l'amplification du cyp51-A1119C contient du MgCl₂ à une concentration finale de 0,5 mM. De plus, le mélange réactionnel de *P. viticola* pour l'amplification du cytb contient de la bétaine à une concentration finale de 1 M, du MgCl₂ 0,5 mM et du DMSO 3 %.

Tableau 2. Tableau des programmes PCR utilisés

| Programme | Étape | Température | Durée |
|-----------|-----------------------|--------------|--------|
| A | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 40 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 60°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| B | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 35 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 60°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| C | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 35 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 62°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| D | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 40 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 56°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| E | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 35 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 64°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| F | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 35 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 63°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| G | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 40 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 61°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| H | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 35 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 46°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |
| I | Dénaturation initiale | 98°C | 2 min |
| | 35 cycles | Dénaturation | 98°C |
| | | Hybridation | 65°C |
| | | Élongation | 72°C |
| | Élongation finale | 72°C | 10 min |

Tableau 3. Amorces utilisées pour le séquençage SANGER et séquences de référence GenBank utilisées pour la détection des mutations associées à la résistance à l'aide du logiciel Geneious

| Espèce | Amorce de séquençage | No accession GenBank de la séquence de référence | Gène cible | Codon | Mutation | Nucléotides de la mutation | Séquence de nucléotides supplémentaires |
|--------------------------------|----------------------|--|------------|-------|---------------------|----------------------------|---|
| <i>Botrytis cinerea</i> | Qoi13extF | AB262969 | Cytb | 143 | G143-WT | GGT | TGAG GG TTTT |
| | | AB428335 | | | Bcbi-143/144 intron | GGT | |
| | | AB262969 | | | G143A | GCT | |
| | sdhF | HQ622630 | Sdhb | 272 | H272-WT | CAC | TGTC CAC ACT |
| | | | | | H272L | CTC | |
| | | | | | H272R | CGC | |
| | | | | | H272V | GTC | |
| | | | | | H272Y | TAC | |
| | | | | 225 | P225-WT | CCC | TGCT TTCT CC |
| | | | | | P225F | TTC | |
| | | | | | P225H | CAC | |
| | | | | 230 | N230-WT | AAC | TGGA AAC AGT |
| | | | | | N230I | ATC | |
| | F412Send | AY220532 | Erg27 | 412 | F412-WT | TTC | ATCT GTCT AC |
| | | | | | F412C | TGC | |
| | | | | | F412I | ATC | |
| | | | | | F412S | TCC | |
| | | | | | F412V | GTC | |
| | BcOS05 | AF396827 | Os-1 | 365 | I365-WT | ATC | GAA ATC GAA |
| | | | | | I365N | AAC | |
| | | | | | I365S | AGC | |
| | | | | 373 | N373-WT | AAC | TGGA AAC ACA |
| | | | | | N373S | AGC | |
| | | | | 369 | Q369-WT | CAG | GTCC CAG GGC |
| | | | | | Q369H | CAC ou CAT | |
| | | | | | Q369P | CCG | |
| <i>Colletotrichum acutatum</i> | Cgramctyb-bf1 | AY285743 | Cytb | 143 | G143-WT | GGT | TGAG GGT GCA |
| | | | | | G143A | GCT | |
| | | | | 129 | F129-WT | TTC | GGT TTCT CTG |
| | | | | | F129L | TTG | |
| | KES719F | XM_007596512.1 | Sdhb | 272 | H272-WT | CAC | TGCC CAC ACG |
| | | | | | H272L | CTC | |
| | | | | | H272R | CGC | |
| | | | | | H272V | GTC | |
| | | | | | H272Y | TAC | |
| | | | | 225 | P225-WT | CCG | TGCC CCGT CT |
| | | | | | P225F | TTC | |
| | | | | | P225H | CAC | |

| | | | | | | | |
|----------------------------|------------------|--------------------------|-------|------|-----------|-----|--------------------|
| | | | | 230 | N230-WT | AAC | TGGA A CTC |
| | | | | | N230I | ATC | |
| <i>Erysiphe necator</i> | ENCBF4 | KY418048.1 | Cytb | 143 | G143-WT | GGT | TGAG G TGCT |
| | | | | | G143A | GCT | |
| | | | | | H242-WT | CAT | TGT C ATACC |
| | SdhB-3R | JNVN01000276.1 | Sdhb | 242 | H242R | CGT | |
| | | | | | | | |
| | CYP51R-Y136 | EF649776.1 EF649777.1 | Cyp51 | 136 | Y136-WT | TAT | GTAT A TGAT |
| | ENcyp1752R-A1119 | KM077178.1 | Cyp51 | 373 | Y136F | TTT | |
| | | | | | A1119-WT | GCA | GCC G CACGA |
| | | | | | A1119C | GCC | |
| <i>Plasmopara viticola</i> | CB279F | DQ459459.1 | Cytb | 143 | G143-WT | GGT | TGG G TGCA |
| | | | | | G143A | GCT | |
| | PVcesA3F | GQ258975.1 | CesA3 | 1105 | G1105-WT | GGC | TTC G GCTCG |
| | | | | | G1105-HTZ | RGC | |
| | | | | | G1105S | AGC | |
| | | | | | | | |

Tableau 4. Interprétation des résultats de séquençage basé sur la relation obtenu en la mutation et la valeur de CI50 des bioessais

| Espèce | Gène | Codon | Mutation | Interprétation de la résistance |
|-------------------------|-------|-------|---------------------|---|
| <i>Botrytis cinerea</i> | Cytb | 143 | G143-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | | Bcbi-143/144 intron | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | | G143A | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | Sdhb | 272 | H272-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7 |
| | | | H272L | n.d. car pas suffisamment de données |
| | | | H272R | Résistant au boscalide |
| | | | H272V | n.d. car pas suffisamment de données |
| | | | H272Y | Résistant au boscalide |
| | | 225 | P225-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7 |
| | | | P225F | Fortement résistant aux fongicides du groupe FRAC 7 |
| | | | P225H | n.d. car pas suffisamment de données |
| | | 230 | N230-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7 |
| | | | N230I | Moyennement résistant aux fongicides du groupe FRAC 7 |
| | Erg27 | 412 | F412-WT | Sensible au fenhexamide (groupe FRAC 17) |
| | | | F412C | Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17) |
| | | | F412I | Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17) |
| | | | F412S | Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17) |
| | | | F412V | Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17) |
| | Os-1 | 365 | I365-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| | | | I365N | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| | | | I365S | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| | | 373 | N373-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| | | | N373S | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| | | 369 | Q369-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| | | | Q369H | n.d. car pas suffisamment de données |

| | | | | |
|--------------------------------|-------|------|-----------|--|
| | | | Q369P | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2 |
| <i>Colletotrichum acutatum</i> | Cytb | 143 | G143-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | | G143A | Très résistant aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | 129 | F129-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | | F129L | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | Sdhb | 272 | H272-WT | <i>C. acutatum</i> est connu comme étant naturellement insensible aux fongicides du groupe FRAC 7. Aucune mutation n'a été détecté sur le gène sdhb dans le cadre du projet 19-2.2-06-PHYTO. |
| | | | H272L | |
| | | | H272R | |
| | | | H272V | |
| | | | H272Y | |
| | | 225 | P225-WT | |
| | | | P225F | |
| | | | P225H | |
| | | 230 | N230-WT | |
| | | | N230I | |
| <i>Erysiphe necator</i> * | Cytb | 143 | G143-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | | G143A | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | Sdhb | 242 | H242-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7 |
| | | | H242R | Résistant au boscalide (résistance inconnue aux autres fongicides du groupe 7) |
| | Cyp51 | 136 | Y136-WT | Sensible aux fongicides du groupe 3 |
| | | | Y136F | Résistant aux fongicides du groupe 3 |
| | Cyp51 | 373 | | Sensible aux fongicides du groupe 3 |
| | | | | Résistant aux fongicides du groupe 3 |
| <i>Plasmopara viticola</i> * | Cytb | 143 | G143-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | | | G143A | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11 |
| | CesA3 | 1105 | G1105-WT | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 40 |
| | | | G1105-HTZ | Sensible aux fongicides du groupe FRAC 40 mais portant un allèle résistant (hétérozygote récessif) |
| | | | G1105S | Résistant aux fongicides du groupe FRAC 40 |

* Les données de génotypage n'ont pas été validées à l'aide de bioessais, il n'est donc pas possible de connaître le facteur de résistance associé à la mutation ni s'il existe des différences de sensibilité pour les différents fongicides d'un même groupe.

1
2
3
4
5
6

ANNEXE II : Revue de littérature

Piuze-Paquet, A. et Van der Heyden, H. 2023. Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon. © Compagnie de recherche Phytodata Inc. 90 p.

7 ANNEXE III : Mémoire de maîtrise

8
9 Poulin-Ouellette, M. (2023). RÉSISTANCE AUX FONGICIDES, AGRESSIVITÉS ET AGENTS CAUSAUX : IMPLICATIONS POUR LA
10 GESTION DE LA MALADIE DE LA BRÛLURE DE LA FEUILLE DE L'OIGNON [Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke].
11

