



**RÉSISTANCE AUX FONGICIDES, AGRESSIVITÉ ET AGENTS CAUSAUX :  
IMPLICATIONS POUR LA GESTION DE LA MALADIE DE LA BRÛLURE DE LA  
FEUILLE DE L'OIGNON**

par

**Marie Poulin-Ouellette**

Mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada

13 janvier 2023



Le 13 janvier 2023

*Le jury a accepté le mémoire Madame Marie Poulin-Ouellette.*

Membres du jury

Professeur Kamal Bouarab  
Directeur de recherche  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Dre Odile Carisse  
Codirectrice de recherche  
Centre de recherche et de développement de Saint-Jean-sur-Richelieu  
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Dr Hervé Van der Heyden  
Codirecteur de recherche  
Compagnie de recherche Phytodata

Professeure Isabelle Laforest-Lapointe  
Évaluatrice interne  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Professeur François Malouin  
Président-rapporteur  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke



## REMERCIEMENTS

Ce projet de maîtrise n'aurait pas pu se réaliser sans l'implication de plusieurs personnes et j'aimerais prendre le temps de le souligner ici (dans l'ordre ou dans le désordre).

Premièrement, merci au Pr Kamal Bouarab d'avoir accepté de diriger mes travaux. Tu as su le faire avec souplesse, objectivité et as démontré une disponibilité remarquable.

Ensuite, merci à mes co-directeurs Dr. Odile Carisse et Dr. Hervé Van der Heyden pour le mentorat unique qu'ils ont su m'offrir. Hervé, merci pour ton honnêteté, ta générosité et tes réflexions toujours *on point*. Tu m'as pris sous ton aile, m'as poussée à me dépasser et pour ça, je te remercie. Odile, merci de m'avoir fait confiance dans ce projet. C'est à travers nos discussions et échanges que j'ai commencé à voir en moi une scientifique rigoureuse dont j'ignorais l'existence il y a deux ans. Merci pour ton humour, tes idées et ton support.

Je tiens à remercier les membres des laboratoires d'AAC et Phytodata : Audrey, Pierre-Olivier, Annie, Cynthia, Mélanie (et j'en passe!) pour leur précieuse expérience et leur aide.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité, Pr. Isabelle Laforest-Lapointe et Pr. François Malouin, pour leur temps et le regard juste qu'ils ont su poser sur le projet.

À mes parents, Isabelle et Sébastien, merci d'avoir nourri en moi la curiosité. Je la cultive chaque jour. Marie-Chloé, ma parfaite, merci pour ton support, ta *drive* et ta chaleur. Merci d'avoir toléré que j'habite à Farnham pendant deux ans. Je vous aime.

En terminant, merci à AAC, au CRSNG et au FRQNT pour leur support tout au long du projet.



## SOMMAIRE

En production maraîchère au Canada, les fongicides de synthèse sont couramment utilisés pour lutter contre les maladies. Cependant, l'efficacité à long terme de ces fongicides est menacée par la résistance grandissante des populations d'agents pathogènes. Pour assurer le contrôle des maladies fongiques tout en limitant la quantité de fongicides appliquée, il est impératif de mettre en place des stratégies qui visent à réduire l'incidence des individus résistants. Cela nécessite une compréhension intime de la biologie des agents pathogènes ainsi que des coûts d'adaptation potentiellement associés à la résistance aux fongicides pouvant les affecter. *Botrytis squamosa*, l'agent causal de la brûlure de la feuille de l'oignon, est aussi influencé par le phénomène de la résistance aux fongicides, bien que peu de rapports récents en font état. De plus, plusieurs autres espèces appartenant au genre *Botrytis* se retrouvent dans les champs d'oignons, mais leur rôle dans la maladie de la brûlure de la feuille et les dynamiques de co-infections ont peu été étudiées dans ce pathosystème. Pour assurer un bon contrôle de la maladie, les programmes d'applications de fongicides devraient tenir compte du niveau de résistance aux fongicides des différentes espèces impliquées. À l'heure actuelle, ils sont basés sur la surveillance de *B. squamosa* uniquement, sans tenir compte du niveau de résistance aux fongicides.

Afin de vérifier l'hypothèse de travail selon laquelle la résistance aux fongicides induit une baisse d'agressivité chez *B. squamosa*, deux objectifs ont été poursuivis dans ce projet : (1) déterminer la sensibilité d'isolats de *B. squamosa* aux huit matières actives homologuées suivantes: boscalid, pyraclostrobine, picoxystrobine, pyriméthanil, fluopyram, fluxapyroxade, fludioxonil, difénoconazole; (2) évaluer l'influence de la résistance sur l'habileté des isolats de *B. squamosa* à causer des lésions sur des plants d'oignons. De plus, afin de vérifier si la présence de *B. cinerea* en co-infection avec *B. squamosa* augmente la sévérité des symptômes de brûlure de la feuille, un troisième objectif a été poursuivi : (3) évaluer la capacité des isolats de *B. cinerea* à causer ou amplifier des symptômes de brûlure de la feuille sur des plants d'oignons



en l'absence et en présence de *B. squamosa*. Pour ce faire, des essais de croissance *in vitro* ont été réalisés sur 90 isolats de *B. squamosa* isolés à partir de feuilles d'oignons symptomatiques prélevées dans des champs d'oignons de la Montérégie. Basée sur un facteur de résistance supérieur à 2, l'incidence de la résistance était de 82.9% pour le boscalid, 79.5% pour le difénoconazole, 4.6% pour le fludioxonil, 78.4% pour le fluopyram, 79.3% pour le fluxapyroxade, 75.6% pour la picoxystrobine, 60.9% pour la pyraclostrobine et 39.1% pour le pyriméthanil. Par la suite, 59 isolats ont été testés pour leur capacité à causer des lésions sur des plants d'oignons en conditions optimales. L'agressivité des isolats n'a révélé aucun coût d'adaptation associé à la résistance aux fongicides. Finalement, la présence de *B. cinerea* dans l'inoculum pendant ou après une infection par *B. squamosa* n'amplifiait pas les dommages de brûlure de la feuille de l'oignon. Ces résultats permettront éventuellement aux intervenants en agriculture d'avoir une analyse plus compréhensive de l'enjeu de la résistance aux fongicides et facilitera la mise en place de solutions de lutte contre la brûlure de la feuille adaptées à la réalité des agents pathogènes visés.

Mots clés : *Botrytis*, résistance aux fongicides, coûts d'adaptation, co-infections, brûlure de la feuille de l'oignon



## TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....	1
<b>1.1 Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Revue de littérature .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Production d'oignons au Québec.....	3
1.2.2 Maladie de la brûlure de la feuille et méthodes de lutte.....	4
1.2.3 Résistance aux fongicides .....	8
1.2.3.1 Mécanismes de résistance .....	9
1.2.3.2 Méthodes de détection.....	10
1.2.4 Stratégies anti-résistance .....	12
1.2.5 Coûts d'adaptation.....	13
1.2.5.1 Coûts d'adaptation In vitro.....	14
1.2.5.2 Coûts d'adaptation In vivo.....	15
1.2.5.3 Coûts d'adaptation In situ.....	15
1.2.6 Maladies causées par les espèces du genre <i>Botrytis</i> dans l'oignon .....	17
<b>1.3 Objectifs.....</b>	<b>20</b>
CHAPITRE 2 VARIATIONS IN FUNGICIDE RESISTANCE PROFILES DO NOT IMPAIR LESION PRODUCTION IN <i>BOTRYTIS SQUAMOSA</i> .....	22
<b>2.1 Résumé.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Portée de l'article et contributions respectives des auteurs.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Abstract.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Introduction.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Materials and methods .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Isolates collection.....	28
2.3.2 Confirmation of <i>Botrytis squamosa</i> isolates' identity using qPCR assay.....	29
2.3.3 Isolate rejuvenation and spore production .....	29
2.3.4 Sensitivity of <i>B. squamosa</i> isolates to fungicides .....	30
2.3.5 Capacity to cause lesions of <i>B. squamosa</i> isolates .....	31

2.3.6 <i>Statistical analysis</i> .....	32
<b>2.4 Results</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5 Discussion</b> .....	<b>40</b>
<b>2.6 References</b> .....	<b>44</b>
<b>2.7 Supplementary information</b> .....	<b>49</b>
CHAPITRE 3 CO-INFECTIONS PAR DEUX ESPÈCES DE BOTRYTIS : IMPLICATIONS POUR LA MALADIE DE LA BRÛLURE DE LA FEUILLE DE L'OIGNON.....	58
<b>3.1 Introduction</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2 Matériels et méthodes</b> .....	<b>62</b>
3.2.1 <i>Provenance des isolats</i> .....	62
3.2.2 <i>Identité des isolats de la Collection 2020</i> .....	63
3.2.3 <i>Mélanges d'isolats</i> .....	63
3.2.4 <i>Production de conidies</i> .....	66
3.2.5 <i>Dispositif expérimental</i> .....	66
3.2.6 <i>Test de sévérité des symptômes sur des plants d'oignons</i> .....	69
3.2.7 <i>Analyses statistiques</i> .....	70
<b>3.3 Résultats</b> .....	<b>70</b>
<b>3.4 Discussion</b> .....	<b>76</b>
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION .....	80
<b>4.1 Retour sur les résultats</b> .....	<b>80</b>
<b>4.2 Conclusion</b> .....	<b>82</b>
ANNEXE.....	85
BIBLIOGRAPHIE .....	88

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre 2

Table 2.1	Table 2.1: Mean and range of EC <sub>50</sub> values per resistance category in 87 <i>B. squamosa</i> isolates.....	36
Table S1	Analysis of variance for capacity to cause lesion on onion leaves of 59 <i>B. squamosa</i> isolates.....	56

### Chapitre 3

Tableau 3.1	Présence aérienne de conidies appartenant aux espèces <i>B. squamosa</i> et <i>B. cinerea</i> dans trois champs d'oignons en Montérégie.....	60
Tableau 3.2	Composition de l'inoculum des huit traitements de co-infection de plants d'oignons par <i>B. squamosa</i> et <i>B. cinerea</i> .....	68

### Annexe

Tableau T1	Test post-hoc de Tukey sur Lésions par cm <sup>2</sup> produites par différents traitements de <i>B. squamosa</i> et <i>B. cinerea</i> sur des plants d'oignons.....	85
Tableau T2	Test post-hoc de Dunnett sur les lésions par cm <sup>2</sup> produites par différents traitements de <i>B. squamosa</i> et <i>B. cinerea</i> sur des plants d'oignons en comparaison avec le témoin positif (T1).....	86



## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 2

Figure 2.1.	Number of lesions per cm <sup>2</sup> of leaf for 59 <i>B. squamosa</i> isolates.....	37
Figure 2.2.	Comparison of log EC <sub>50</sub> values for eight active ingredients between categories based on capacity to cause lesions for 53 <i>B. squamosa</i> isolates.....	38
Figure 2.3	Effect of the number of resistances to eight active ingredients on the capacity of <i>B. squamosa</i> to cause lesions on onion leaves.....	39
Figure S1	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to pyraclostrobin dose.....	49
Figure S2	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to Boscalid dose.....	50
Figure S3	Adjusted growth curves a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to picoxystrobin dose.....	51
Figure S4	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to fluxapyroxad dose.....	52
Figure S5	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to pyrimethanil dose.....	53
Figure S6	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to difenoconazole dose.....	54
Figure S7	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to fluopyram dose.....	55
Figure S8	Adjusted growth curves on a subset of 4 <i>B. squamosa</i> isolates according to fludioxonil dose.....	56

### Chapitre 3

Figure 3.1	Exemple de test d'agressivité <i>in vivo</i> d'isolats de <i>B. cinerea</i> sur des feuilles d'oignons verts.....	65
Figure 3.2	Aggressivité de 59 isolats de <i>B. squamosa</i> sur des plants d'oignons.....	71
Figure 3.3	Aggressivité de 13 isolats de <i>B. cinerea</i> sur des feuilles d'oignons.....	72
Figure 3.4	Lésions par cm <sup>2</sup> produites par différents traitements de <i>B. squamosa</i> et <i>B. cinerea</i> sur des plants d'oignons.....	73
Figure 3.5	Symptômes attribuables à <i>B. cinerea</i> et <i>B. squamosa</i> sur des plants d'oignons	75





## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
PCR-RFLP	Analyse de polymorphisme de longueur de fragments
PIRA-PCR	Analyse de restriction introduite par l'amorce
ANOVA	Analysis of variance
AP	Anilio-pyrimidines
CCL	Capacité à causer des lésions
cm	Centimètres
EC <sub>50</sub>	Concentration efficace
cv	Cultivar
°C	Degré Celsius
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
eq	Equation
FRAC	Fungicide resistance action committee
g	Gramme
ha	Hectare
h	Heure
DMI	Inhibiteurs de la C-14 déméthylase
MBI-D	Inhibiteurs de la biosynthèse de la mélanine déshydratase
SDHI	Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase
QoI	Inhibiteurs externes de la Quinone
kPa	Kilopascal
L	Litre
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>

MG	Mean growth
μL	Microlitre
G\$	Milliard de dollars
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MDR	Multi drug resistance
ng	Nanogramme
nm	Nanometre
OLB	Onion leaf blight
ppm	Parts per million
PP	Phénylpyrroles
PDA	Potato dextrose agar
%	Pourcent
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
RH	Relative humidity
RF	Resistance factor
SNP	Single nucleotide polymorphism
sdhB	Sous-unité B de la succinate déshydrogénase
sdhC	Sous-unité C de la succinate déshydrogénase



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Introduction générale

Au cours des cinq dernières années, l'utilisation des pesticides en agriculture a occupé une place importante dans l'espace médiatique au Québec (CAPERN 2020). Des préoccupations grandissantes quant à la toxicité élevée de certains pesticides ont accéléré le retrait de plusieurs produits précédemment homologués (Runkle et al., 2017; Labrie et al., 2020). Malgré cela, les producteurs sont contraints d'utiliser des stratégies de phytoprotection adaptées à leur mode de production, souvent conventionnel.

Dans ce contexte, même en adoptant les outils de lutte intégrée, l'utilisation de fongicides reste une pratique courante au Canada (Gossen et al., 2014). Bien que les technologies derrière les fongicides aient évolué depuis les années 1960, notamment avec l'arrivée des fongicides unisites qui sont moins toxiques pour l'environnement et la santé humaine, plusieurs questions se posent quant à leur efficacité à long terme (Gossen et al., 2014; Hann 2014; Rupp et al., 2017; Russel 2005). En effet, il a été observé qu'un nombre grandissant de champignons phytopathogènes possèdent une ou plusieurs mutations au niveau des gènes ciblés par le mode d'action des fongicides, ce qui leur confère une résistance accrue aux fongicides (Mair et al 2016). Au fil des applications, ces individus résistants sont sélectionnés et occupent une place de plus en plus importante dans la population de champignons pathogènes, ce qui réduit l'efficacité des fongicides utilisés (Hahn 2014; Kozhar et al., 2020).

Pour assurer le contrôle des maladies fongiques tout en limitant la quantité de fongicides appliquée, il est impératif de mettre en place des stratégies qui visent à réduire l'incidence des individus résistants dans la population de champignons phytopathogènes (Allen et al. 2017). Cependant, la mise en place de telles stratégies nécessite une compréhension intime de la

biologie de l'agent pathogène ainsi que des coûts d'adaptation potentiellement associés à la résistance aux fongicides (Mikaberidze et al., 2013).

Dans le cadre de ce projet, je me suis intéressée à la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon causée par *Botrytis squamosa* (Walker 1925). Cette maladie fait partie des principales causes de pertes de rendements dans la culture d'oignons (Carisse et al., 2011). Malgré l'utilisation fréquente de fongicides à haut risque de développement de résistance dans les cultures d'oignons, peu de rapports récents font état de la résistance aux fongicides (Tremblay et al., 2003; Carisse et Tremblay 2007; Van der Heyden et al., 2014). Plusieurs outils de surveillance spécifiques sont utilisés pour prédire le risque de développement de la maladie. La prise de décision est normalement basée sur trois facteurs : la présence de l'agent pathogène, son abondance et les conditions environnementales (Carisse et al., 2012). Cependant, ces trois facteurs expliquent-ils à eux seuls le développement de la maladie? Qu'arrive-t-il lorsqu'on est en présence de résistance aux fongicides? Cela a-t-il un impact sur l'agressivité? Par ailleurs, est-ce que la surveillance est trop spécifique? Lorsque *B. squamosa* se retrouve en présence d'autres agents pathogènes du genre *Botrytis*, est-ce qu'on assiste à une augmentation des dommages de la brûlure de la feuille?

Dans la perspective de réduire la dépendance aux fongicides et de poursuivre les efforts pour rendre la lutte contre la maladie de la brûlure de la feuille plus durable, un constat s'impose: il faut comprendre ce qui limite l'efficacité des fongicides utilisés contre la brûlure de la feuille de l'oignon, principalement en analysant de façon compréhensive la résistance aux fongicides dans la population de *B. squamosa*. Dans une large mesure, les études sur la résistance aux fongicides concernent les méthodes de détection, l'identification de substitutions génétiques associées à la présence de résistance et à l'estimation de l'incidence de la résistance (Li et al., 2021; Toffolati et al., 2020; Leroux et al., 2010). Il existe relativement peu de travaux de recherche sur l'écologie et le coût d'adaptation des individus résistants ou les stratégies anti-résistances (Lalève et al., 2014 et Walker et al., 2017). Cependant, de telles études seront nécessaires, à terme, pour interpréter les résultats provenant des différents systèmes prévisionnels et autres outils d'aide à la décision.

## 1.2 Revue de littérature

### 1.2.1 Production d'oignons au Québec

Au cours de la dernière décennie, la valeur des légumes à la ferme n'a cessé de croître au Canada pour atteindre 1.4 G\$ en 2021 (Statistique Canada 2021a). Dans ce contexte, les producteurs ont un fort incitatif à maintenir, voire augmenter leurs rendements. Parmi les productions légumières importantes, les oignons secs étaient cultivés sur une superficie de près de 5 708 ha en 2020 au Canada, dont 42% se situaient en Ontario et 38% au Québec (Statistique Canada 2021b).

La majorité de la production québécoise se situe dans les terres noires de la Montérégie (Carisse et al., 2011). Bien que la production d'oignons en sol organique soit confrontée à plusieurs défis environnementaux spécifiques, tels que les besoins en eau et la perte de sol due à la décomposition rapide de matière organique, l'érosion et la minéralisation (Kroetsch et al., 2011), un des grands défis demeure la phytoprotection. Dans le contexte des changements climatiques et de l'importance croissante de la résistance aux fongicides, les maladies fongiques représentent une menace de plus en plus importante (Gossen et al., 2014). Les cultures d'oignons sont sensibles à plusieurs maladies, notamment la brûlure de la feuille, le mildiou, la brûlure stemphylienne, le charbon, la pourriture du col, la pourriture basale fusarienne, la tache pourpre et la pourriture blanche. Toutefois, la brûlure de la feuille (*Botrytis squamosa*) et le mildiou (*Perenospora destructor*) sont les principales maladies responsables des pertes de rendements et de qualité au Québec (Carisse et al., 2011, Van der Heyden et al. 2020).

### 1.2.2 Maladie de la brûlure de la feuille et méthodes de lutte

La brûlure de la feuille de l'oignon fait partie des principales sources de pertes de rendements dans la culture d'oignons (Carisse et al., 2011). Bien qu'il y ait peu de rapports récents sur les pertes dûes exclusivement à la brûlure de la feuille, les études existantes rapportent une perte potentielle allant jusqu'à 30% si la maladie n'est pas contrôlée, en plus de compromettre l'entreposage et l'efficacité des traitements anti-germinatifs (Carisse et al., 2011; de Visser 1996).

La brûlure de la feuille de l'oignon est causée par un champignon phytopathogène de la division des ascomycètes, *Botrytis squamosa* (Walker 1925a), qui hiverne dans les résidus de cultures et dans le sol sous forme de sclérotés (structures de survie) ou de mycélium. Au printemps, *B. squamosa* peut se reproduire de façon sexuée en formant des ascospores sur les sclérotés ayant hivernés, mais le fait plus souvent de façon asexuée en produisant des conidies directement sur les sclérotés (Ellerbrock et Lorbeer 1977). Lorsqu'une conidie germe à la surface d'une feuille, elle la pénètre soit par les stomates, soit en longeant la paroi anticline des cellules épidermiques (Steentjes et al., 2021a). La température et la période de mouillure sont des facteurs déterminants dans l'infection. En effet, les conditions d'infections sont optimales lorsque la température se situe autour de 20°C et que l'humidité relative est maintenue au-dessus de 90% (Carisse et al., 2012). Les symptômes de la maladie se déclinent en deux phases distinctes. Pour la première, les premiers signes de la maladie apparaissent en 24h à 48h sous forme de petites lésions blanches entourées d'un halo (Carisse et al., 2011). Par la suite, lorsque le champignon est en mesure de coloniser une plus grande surface à l'intérieur des feuilles, on observe la brûlure des pointes, qui constitue la deuxième phase de la maladie. C'est principalement à partir de ces tissus nécrosés que les conidies sont en mesure de sporuler, se disperser et causer de multiples infections secondaires au cours de la saison estivale, ce qui en fait une maladie polycyclique (Hancock et Lorbeer, 1963).

Suivant une approche de lutte intégrée, il existe certaines mesures de prévention et de contrôle non chimique pouvant être utilisées pour réduire la pression de la maladie. Certaines pratiques culturales telles que la rotation avec des plantes de familles différentes, un espacement entre les

rangs élevés et donc une densité de la population d'oignon réduite, qui permet une réduction du temps de mouillure des feuilles (risque d'infection réduit), ainsi que le retrait ou la destruction des résidus de culture sont des pratiques qui aident à prévenir le développement de la maladie (Carisse et al., 2006; Mertely et al., 2000). En pratique, on observe que les producteurs suivent des rotations de trois ans ou moins, souvent avec des carottes ou de la laitue, qu'ils enfouissent les résidus de culture et dans bien des cas implantent une culture de couverture. L'espacement tend quant à lui à être réduit plutôt qu'augmenté. En effet, il est optimisé pour répondre à la demande du marché qui requiert un calibre uniforme et un diamètre spécifique; augmenter l'espacement changerait les calibres. De plus, une augmentation de l'espacement tend à augmenter l'incidence des pourritures bactériennes. Contre la brûlure de la feuille de l'oignon, les biofongicides homologués sont limités et se résument à quelques formulations de *Bacillus spp.* aux modes d'action préventifs. Certaines souches de *Bacillus subtilis* agissent, par exemple, en colonisant la surface des feuilles compétitionnant avec *B. squamosa* pour l'espace. Elles induisent également les mécanismes de défense des plantes ou sécrètent des lipopeptides toxiques pour les champignons (Cawoy et al., 2014). Globalement, les fongicides de synthèse sont encore aujourd'hui un aspect incontournable de la lutte contre la brûlure des feuilles.

Au cours des 40 dernières années, les programmes de phytoprotection ont beaucoup évolué. En effet, la nature des produits utilisés ainsi que les outils d'aide à la décision disponibles ont permis de réduire la pression de la maladie au Québec (Carisse et al., 2011) ainsi que le nombre d'applications de fongicides (Carisse et al., 2005; Carisse et al., 2009). À la fin des années 1980, les programmes de gestion intégrée étaient basés sur le dépistage, s'est ajouté ensuite l'utilisation des systèmes prévisionnels basés principalement sur des données environnementales (Shoemaker et Lorbeer 1977; Boivin et Sauriol 1984; Carisse et al., 2011). Le développement rapide des outils de biologie moléculaire au début des années 2000 a permis des avancées importantes sur le plan de la détection des agents pathogènes (Ward et al., 2004). Ainsi de nos jours, il n'est pas rare que des données moléculaires soient intégrées dans des systèmes prévisionnels. Par exemple, au Québec, il existe depuis 2008 un réseau de surveillance qui combine le comptage moléculaire (qPCR) à l'aérobiologie et aux modèles prévisionnels qui permet de surveiller en temps quasi réel le développement de la maladie sur le terrain (Carisse



et al., 2008; Carisse et al., 2012). Ce réseau de capteurs de spores permet de quantifier l'inoculum aérien de différents agents pathogènes de l'oignon, tels que *B. squamosa* (Carisse et al., 2009) et *P. destructor* (Van der Heyden et al., 2020). Les données générées sont utilisées pour coordonner et circonscrire les applications de fongicides.

En fonction du stade de développement de l'oignon et du risque d'infection, deux types de fongicides peuvent être utilisés: les fongicides de contact et les fongicides translaminaires absorbés par les feuilles d'oignon (Carisse et al., 2011). Les premiers restent sur la surface des feuilles et préviennent les nouvelles infections en inhibant la germination des spores ou en empêchant leur pénétration dans les feuilles. Ces produits ont souvent un large spectre d'action et ciblent plusieurs fonctions différentes chez les champignons. Des produits de cette catégorie tels que le chlorothalonil, le mancozèbe ou le cuivre sont homologués au Canada. Les seconds sont des fongicides dits « curatifs », car ils pénètrent et se redistribuent localement ou de façon systémique dans la plante et interrompent la progression de l'infection. La majeure partie de ces produits ciblent des fonctions métaboliques précises chez les champignons phytopathogènes, c'est pourquoi on les appelle aussi des fongicides unisites. Cette spécificité leur confère une toxicité moindre pour les autres organismes.

La majorité des fongicides unisites utilisés pour contrôler la brûlure de la feuille de l'oignon au Canada appartiennent au groupe des inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI, groupe FRAC 7<sup>1</sup>) ainsi qu'au groupe des inhibiteurs externes de la Quinone (QoI, groupe FRAC 11), plus communément appelés les strobilurines. La 3<sup>e</sup> génération des SDHI est homologuée contre les maladies fongiques dans les cultures d'oignons depuis la moitié des années 2000. Les matières actives appartenant à ce groupe ciblent une des quatre sous-unités du complexe II de la chaîne de respiration mitochondriale et entravent le processus de respiration (Avenot et Michailides 2010). Quant aux QoI, ils sont utilisés depuis le milieu des années 1990. Ces fongicides ciblent un site particulier (le Qo) sur le cytochrome b dans la paroi mitochondriale des champignons. Cela inhibe le processus de respiration cellulaire et par conséquent la production d'ATP (Bartlet et al., 2002; Gossen et al., 2014). Ces deux groupes de fongicides

---

<sup>1</sup> Pour faciliter la compréhension, la classification des fongicides selon la *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) est donnée.

représentent, à eux seuls, 50% des fongicides de synthèse (unisites, multisites ou en mélanges) homologués pour combattre la brûlure des feuilles de l'oignon au Québec (SaGE pesticides).

Des fongicides appartenant aux groupes des inhibiteurs de la C-14 déméthylase (DMI, groupe FRAC 3), des anilio-pyrimidines (AP, groupe FRAC 9) et des phénylpyrroles (PP, groupe FRAC 12) sont aussi utilisés pour le contrôle de la maladie. Le groupe des DMI (FRAC 3) inclut une grande variété de groupes chimiques tels que les pyrimidines ou les triazoles et donc, fait référence à un spectre d'action assez vaste (FRAC 2022). Si l'on regarde plus spécifiquement le mode d'action des triazoles, il consiste globalement à inhiber la synthèse de l'ergostérol en ciblant l'enzyme 14 $\alpha$ -déméthylase (Bower et Denning 2014). Pour les anilio-pyrimidines (FRAC 9), bien que le mode d'action précis soit encore incertain, ils inhibent la synthèse de la méthionine en plus d'induire la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (Leroux et al., 2002). Enfin, les phénylpyrroles (FRAC 12), qui sont des dérivés synthétiques de la pyrrolnitrin (un antifongique naturel sécrété par certaines bactéries du genre *pseudomonas*) induisent une accumulation intracellulaire rapide de certains métabolites secondaires tels que le glycérol (Kilani et Fillinger 2016). Le mode d'action précis de ce groupe chimique reste encore à déterminer, bien que l'inhibition d'une protéine kinase soit observée (Kilani et Fillinger 2016). Dans une moindre mesure, des découpleurs de la phosphorylation oxydative (groupe FRAC 29) sont aussi permis pour le contrôle la brûlure de la feuille de l'oignon au Canada.

Bien que les fongicides de synthèse soient des outils importants pour la majorité des producteurs d'oignons, leur utilisation ne fait pas l'unanimité dans la société civile. Les effets néfastes sur la santé humaine de certains fongicides multisites comme le mancozèbe (Runkle et al., 2017), la persistance globale des fongicides dans l'environnement et leur effet sur la faune (Belden et al., 2010) sont préoccupants pour plusieurs groupes environnementaux et de consommateurs. Au cours des cinq dernières années, il a beaucoup été question de la place et l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'espace médiatique au Québec (CAPERN 2020). Il en ressort que la société québécoise désire une réduction d'utilisation des pesticides de synthèse en agriculture et serait même prête à payer pour mener à bien cet objectif (Lévesque et al., 2021). Dans la perspective de réduire la dépendance à ces produits et de poursuivre les efforts pour rendre la lutte contre la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon plus durable, il faut aussi

comprendre ce qui limite l'efficacité des fongicides utilisés contre cette maladie, entre autres en analysant de façon compréhensive la résistance aux fongicides des agents pathogènes d'intérêt.

### 1.2.3 Résistance aux fongicides

Le problème de la résistance aux fongicides n'est pas cantonné à la lutte contre les maladies dans les cultures d'oignons. En effet, la résistance aux produits antiparasitaires est limitante pour le contrôle de nombreux agents pathogènes agricoles, mais aussi médicaux (Hanh et al., 2014; Forsberg et al., 2019). On rapporte avoir observé de la résistance pour toutes les classes de fongicides utilisées en agriculture mondialement chez plusieurs agents phytopathogènes d'importance (Fisher et al. 2018). Les études récentes portant sur la résistance aux fongicides chez *Botrytis cinerea* affichent toutes des tendances similaires : la proportion d'isolats résistants est élevée (20% à 100%) pour certaines catégories de fongicides telles que les SDHI, les QoI et les AP et on retrouve une part croissante d'isolats résistants à plusieurs catégories de fongicides différentes (>3) (Weber et Hahn 2019; Shao et al., 2021; Rupp et al., 2017).

Les premières observations de résistance aux fongicides remontent aux années 1960 (Russel 2005), mais ce n'est que dans les années 1980 qu'on rapporte une baisse d'efficacité majeure pour certains groupes de produits tels que les benzimidazoles pour la répression de *Botrytis cinerea* dans la vigne (Russel 2005). La précarité de plusieurs fongicides face à la résistance des populations d'agents pathogènes a mené à la formation de la *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) par plusieurs compagnies impliquées dans le développement et la commercialisation de produits phytopharmaceutiques (Russel 1995). Une contribution importante de la FRAC est la catégorisation des fongicides en différents groupes. Les groupes FRAC comprennent les produits ayant les mêmes modes d'action et les mêmes cibles. Ainsi, les SDHI et les QoI, bien que tous deux inhibent la respiration cellulaire, ne ciblent pas les mêmes processus cellulaires et sont donc catégorisés dans des groupes FRAC distincts. Généralement, on considère qu'il existe une résistance croisée positive entre les produits appartenant aux mêmes groupes FRAC, bien qu'il existe certaines exceptions (Amiri et al.,

2020). Cela a pour but d'aider aux choix de produits tout en prenant en compte la gestion de la résistance aux fongicides.

Bien que le maintien de l'efficacité des fongicides soit d'intérêt particulier pour les détenteurs de brevet sur ces technologies, c'est aussi un enjeu agroenvironnemental important. En effet, la baisse d'efficacité d'un produit peut mener à son application plus fréquente et en doses plus concentrées pour arriver au contrôle désiré d'une maladie. L'application d'un produit phytosanitaire inefficace engendre aussi des conséquences telles que l'utilisation d'énergie fossile supplémentaire, la compaction des sols en plus du coût associé à la main d'œuvre, le tout, sans réduire la progression de la maladie. La préservation de la sensibilité d'une population d'agent pathogène à une matière active est par conséquent une étape cruciale de la réduction d'utilisation des fongicides et des conséquences agroenvironnementales et économiques connexes.

#### *1.2.3.1 Mécanismes de résistance*

Il y a quatre mécanismes connus pouvant mener à une réduction de la sensibilité d'un champignon à une molécule toxique (fongicide). Premièrement, la surexpression de la cible survient lorsque des mutations augmentent la transcription du gène ciblé par le produit antifongique (Ma et al., 2006). Ainsi, bien que le pesticide atteigne sa cible, une quantité suffisante du gène cible demeure fonctionnelle. Deuxièmement, l'exportation, parfois affichée comme le «*multidrug resistance mechanism*» (MDR) dans la littérature, est une forme de résistance caractérisée par la surexpression de deux types de pompes à efflux dans la membrane plasmique soit les transporteur *ABC* «*artB*» (phénotype MDR1) ou les transporteurs *MFS* «*MfsM2*» (phénotype MDR2). Ces phénotypes sont respectivement le résultat de mutations ponctuelles sur un gène codant pour un régulateur transcriptionnel (*Mrr1*) et d'un réarrangement dans la région promoteur du transporteur *MfsM2* (Hahn 2014). Ces pompes ont la capacité d'expulser différentes molécules chimiques à l'extérieur de la cellule et ainsi réduire la sensibilité d'un individu au produit antiparasitaire appliqué (Kretschmer et al., 2009). Par exemple, on rapporte une tolérance jusqu'à 20 fois plus élevée au cyprodinil chez les souches

de *B. cinerea* MDR1 que chez les souches sensibles. Troisièmement, le contournement métabolique consiste à utiliser une voie métabolique différente de celle ciblée par un fongicide (Hawking et Fraaije 2018). Par exemple, il est possible pour certains champignons d'utiliser une oxydase alternative et ainsi de compléter la chaîne de respiration et produire de l'ATP, même en présence d'un inhibiteur de la Quinone (FRAC 11) (Wood et Hollomon 2003). Quatrièmement, la modification du site cible peut, selon le mode d'action du fongicide, amener un changement de conformation de la protéine et ainsi réduire l'affinité entre le fongicide et sa cible (Kretschmer et al 2009). Une mutation ponctuelle, soit par la substitution d'un seul nucléotide sur le gène codant par un autre (souvent appelée "SNP") ou par l'insertion ou la délétion d'un ou plusieurs nucléotides, est suffisante pour générer un acide aminé différent (Hahn 2014). Les individus possédant ces mutations existent naturellement dans l'environnement, bien que leur incidence initiale soit extrêmement faible (Hobbelen et al., 2014). Par contre, l'utilisation de fongicides unisites induit une pression de sélection sur la population pathogène et augmente grandement la fréquence de ces mutants au fil du temps. La fréquence est si élevée que la substitution d'acides aminés est considérée comme la source de résistance la plus répandue chez les champignons (Mair et al., 2016).

#### 1.2.3.2 Méthodes de détection

Connaître et monitorer la sensibilité d'un champignon phytopathogène est nécessaire pour lutter contre le développement de la résistance ainsi que pour prendre les décisions de lutte adéquates (Gossen et al., 2014). Il existe deux avenues principales pour étudier la résistance aux fongicides: la première est une approche phénotypique et la seconde une approche génotypique.

Les essais de phénotypage consistent globalement à évaluer la capacité d'un isolat à croître en fonction de la dose de fongicide à laquelle il est soumis. Ils servent à établir la concentration efficace ( $EC_{50}$ ), c'est-à-dire la concentration de fongicide qui induit 50% de la réponse (la croissance) en l'absence du produit. Ces essais sont normalement effectués *in vitro*. Il est possible d'évaluer plusieurs éléments, notamment la croissance radiale mycélienne, la croissance mycélienne en milieu liquide, le pourcentage de germination des spores, etc. (Leroux

et al., 1999, Carisse et Tremblay 2007, Liang et al., 2019). Les essais de phénotypage sont souvent la première étape quand il s'agit d'évaluer l'effet d'une nouvelle matière active sur une population de champignons phytopathogènes ou bien quand il s'agit d'établir le facteur de résistance d'une mutation, c'est-à-dire d'établir le degré de résistance des souches mutantes en fonction des souches sensibles (Stammler et Speakman 2006; Leroux et al., 2010). Il est aussi possible de phénotyper des isolats en utilisant des doses discriminantes de fongicides. La croissance ou non à ces doses, déterminées par des études antérieures en phénotypage, permet de classer un isolat comme étant résistant ou non au fongicide testé (Yin et al., 2018). L'utilisation de doses discriminantes permet de réduire le nombre de traitements nécessaires pour évaluer la sensibilité d'un isolat. Les essais de phénotypage pour la résistance aux fongicides sont accessibles, car leur réalisation ne requiert souvent peu ou pas d'équipement spécialisé. De plus, leur réalisation peut se faire sans connaître le mécanisme génétique de la résistance. Par contre, ils requièrent d'avoir accès à une collection appréciable d'isolats viables et sont relativement longs à réaliser.

Les tests de résistance effectués grâce à des outils moléculaires consistent à évaluer l'absence ou la présence de certaines mutations associées à la résistance aux fongicides dans un échantillon d'ADN. Ces mutations peuvent être détectées grâce à différents tests basés sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR), entre autres l'analyse de polymorphisme de longueur de fragments (PCR-RFLP) (Nielsen et al., 2002) ou l'analyse de restriction introduite par l'amorce (PIRA-PCR) (Veloukas et al., 2011). Il existe aussi des tests utilisant la PCR en temps réel (qPCR) ou le LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) par exemple à travers l'utilisation d'allèles spécifiques (Billard et al., 2011; Fan et al., 2018). Aujourd'hui, la plus grande accessibilité des technologies de séquençage telles que le séquençage SANGER ou le pyroséquençage permettent de séquencer une section de gène d'intérêt et d'observer la présence ou l'absence de mutations à certaines positions (Hollomon et Ishii 2015; Gobeil-Richard et al., 2016). Bien entendu, les tests de résistance aux fongicides par génotypage requièrent un certain travail de phénotypage en amont pour établir le lien entre la ou les mutations, la résistance au fongicide ainsi que le facteur de résistance observé pour un fongicide. En revanche, une fois ces paramètres établis, le génotypage pour la résistance aux fongicides ne requiert pas le maintien

d'une mycothèque et permet d'obtenir de l'information sur la résistance aux fongicides dans une population plus rapidement que pour les essais en phénotypage. Ces tests sont particulièrement intéressants pour les parasites obligatoires qui doivent être cultivés sur des plantes vivantes. Les technologies de séquençage de 3e génération offrent aussi des avenues intéressantes pour le futur de l'étude de la résistance aux fongicides. En effet, le développement rapide des technologies de séquençage ouvre la voie à des diagnostics décentralisés et portatifs en plus de fournir de l'information en temps quasi réel (Radhakrishnan et al., 2019).

#### *1.2.4 Stratégies anti-résistance*

Bien que la surveillance de la résistance aux fongicides soit centrale dans un plan de phytoprotection durable, l'interprétation des résultats issus des différents tests de résistance demeure un défi important. Par exemple, les seuils (ou pourcentage) de résistance à partir desquels il n'est plus rentable ou utile d'appliquer un produit ne sont pas encore définis.

Certaines pratiques sont recommandées pour freiner le développement de la résistance chez les champignons phytopathogènes. Parmi celles-ci, l'utilisation de fongicides multisites tels que les dithiocarbamates et les phthalimides dans des mélanges avec des fongicides unisites permettrait un contrôle efficace avec une sélection moindre des souches résistantes aux fongicides (Russel 2005; Mikaberidze 2013). Par contre, l'utilisation de plusieurs fongicides multisites soulève de plus en plus d'enjeux environnementaux dus à leur grande toxicité pour plusieurs organismes, si bien que les organismes de réglementation en interdisent graduellement leur utilisation (ARLA 2022). Par exemple au Québec, l'utilisation de fongicides multisites va à l'encontre de certains objectifs agroenvironnementaux qui visent à réduire les indices de risques dans les fongicides utilisés (plan d'agriculture durable 2020-2030 objectif #1, indicateur 1.2). D'autres stratégies anti-résistances existent, telles que l'alternance ou la rotation, qui consiste à utiliser des fongicides de différentes familles en alternance dans le temps ou dans l'espace. Ces stratégies sont basées sur l'hypothèse que les souches résistantes aux fongicides sont moins performantes que les souches sensibles en l'absence de pression de sélection exercée par l'arrosage du fongicide. En évitant d'appliquer un fongicide sur une parcelle, on favorise la

prolifération des souches sensibles au détriment des souches résistantes (Eldfield et al., 2018). Ainsi, lorsqu'on réintroduit le fongicide, son efficacité serait en partie restaurée (Allan et al., 2017). En réalité, cette hypothèse reste à confirmer pour bien des espèces de champignons et bien des fongicides (Hawkings et Fraaije 2018). Les dynamiques de résistance à l'intérieur des populations de champignons phytopathogènes sont complexes. En effet, les différents cycles de vies, la présence potentielle de coûts d'adaptation associés à la résistance aux fongicides, l'agressivité variable entre différentes souches de champignons et les dynamiques de propagation des différentes espèces font partie d'une équation complexe qu'on tente de décoder (Walker et al., 2017). Globalement, il est encore difficile d'évaluer l'efficacité réelle des fongicides unisites et de prédire leur durée de vie. Cela pose des défis agronomiques importants, notamment au niveau des recommandations quant à l'utilisation des fongicides pour éviter le développement de la résistance.

#### *1.2.5 Coûts d'adaptation*

Le coût d'adaptation ou «*fitness cost*», lorsqu'associé à une mutation, définit la corrélation négative entre la présence de l'allèle mutée et les aptitudes phénotypiques et écologiques d'un organisme (Walker et al., 2017; Basener and Standford 2018; Lenormand et al., 2018). Comme la cause génétique de la résistance est parfois inconnue, le coût d'adaptation peut aussi être défini comme le lien entre la résistance et la capacité à maintenir la population par la survie, la croissance et la reproduction. La présence potentielle de coûts d'adaptation associés à une ou plusieurs mutations conférant une résistance aux fongicides est une information centrale si l'on veut mettre en place des stratégies de gestion de la résistance conséquentes avec la biologie des agents pathogènes (Mikaberidze et al., 2013). Si le coût d'adaptation est élevé, il sera plus difficile pour les individus résistants d'assurer leur reproduction. Les prochaines lignes explorent les coûts d'adaptation associés à la résistance aux fongicides répertoriés chez les ascomycètes et les différentes approches méthodologiques utilisées pour mesurer ce coût.



#### 1.2.5.1 Coûts d'adaptation *In vitro*

Comme le relevait Gilchrist et al., (2006), la diversité des cycles de vie chez les champignons peut être à l'origine du manque de cadre théorique entourant les paramètres associés aux aptitudes phénotypiques dans ce royaume comparativement aux animaux ou aux végétaux. À l'heure actuelle, peu de paramètres sont bien reconnus: la croissance mycélienne et la production de spores en sont deux, bien que plusieurs autres facteurs puissent influencer la capacité d'adaptation d'un isolat (Pringle et Taylor 2002). Ainsi, il est possible de mesurer différents paramètres d'aptitude phénotypique *in vitro* tels que la croissance mycélienne, la production et la viabilité de sclérotas et des conidies, la résistance au gel, la sensibilité osmotique et oxydative et plusieurs autres (Amiri et al., 2020; Delmas et al., 2017; Ajouz et al., 2010; Billard et al., 2011; Chen et al., 2016; Hsiang et al., 1998; Molaei et al., 2019; Raposo et al., 2000; Scalliet al., 2012; Veloukas et al., 2014; Rupp et al., 2017).

Il a été observé que les souches de *B. cinerea* résistantes au dicarboxamide avaient une sensibilité accrue au stress osmotique (Cui et al. 2002; Oshima et al 2006). Celles possédant des mutations sur la sous-unité C de la succinate déshydrogénase (sdhC) conférant une résistance au fluopyram exhibaient une sensibilité accrue aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), au stress osmotique en plus d'une sporulation et une production de sclérotas inférieure aux souches exemptes de mutations sur le sdhC (Amiri et al., 2020). Chez *Penicillium expansum*, Karaoglanidis et al., (2011) ont rapporté une croissance mycélienne réduite chez les souches ayant une insensibilité à l'iprodione, au tebuconazole et au fludioxonil. Ces auteurs ont aussi observé que les souches insensibles avaient une capacité réduite à produire de la patuline, une mycotoxine chez *P. expansum*. Bien que l'étude de paramètres d'aptitudes phénotypiques *in vitro* permette d'élucider certaines questions biologiques importantes, elle implique aussi que certaines hypothèses en rapport à la sélection naturelle exercée sur les aptitudes phénotypiques étudiées demeurent spéculatives (Pringle et Taylor 2002).

#### 1.2.5.2 Coûts d'adaptation *In vivo*

On définit la capacité concurrentielle comme étant l'habileté d'une espèce à en exclure une autre (Hart et al., 2018). C'est un paramètre important dans l'étude des dynamiques de résistance aux fongicides, car les souches sensibles et les souches résistantes occupent les mêmes niches écologiques et sont donc en compétition pour ces niches (Mikaberidze et McDonald 2015). Il est possible de tester la capacité concurrentielle en conditions contrôlées en inoculant du matériel végétal avec un inoculum contenant un ratio connu de souches appartenant à différents génotypes (Mouafo-Tchinda et al., 2022), par exemple sensibles et résistantes. Ces expériences sont effectuées sur un ou plusieurs cycles de reproduction pour comprendre les dynamiques de population. Bien qu'il soit possible de tester la capacité concurrentielle *in vitro*, les essais de compétitivité *in vivo* se rapprochent plus du cycle de vie naturel des agents pathogènes (Lalève et al., 2014). En revanche, la diversité des mécanismes de résistance pouvant être étudiés complexifie souvent la comparaison entre les différentes études. C'est le cas de Veloukas et al., (2014) qui en inoculant des spores sur des pommes ont observé une baisse significative de la proportion de souches de *B. cinerea* résistantes au boscalid par rapport aux souches sensibles en l'absence de traitement de fongicides. Ces résultats contrastent avec ceux de Rupp et al., (2017) qui ne révèlent aucun avantage compétitif des souches sensibles de *B. cinerea* sur les souches multirésistantes, bien que différents mécanismes de résistance aient été étudiés.

#### 1.2.5.3 Coûts d'adaptation *In situ*

L'étude des coûts d'adaptation à travers l'observation de l'évolution de la résistance aux fongicides au champ est issue d'une approche de génétique des populations. Cette approche vise à quantifier la capacité concurrentielle de certaines souches en mesurant leur fréquence sur plusieurs générations (Zhan et McDonald 2013; Walker et al., 2017). Ainsi, la présence ou l'absence d'un coût d'adaptation lié à une résistance aux fongicides peut être déduite par l'évolution de la fréquence de ces allèles au fil des saisons (Hagerty et al., 2016; Raposo et al., 2000).

Suivant cette approche de génétique des populations, des études ont révélé une baisse des allèles mutantes échantillonnées dans des souches de *B. cinerea* six ans après le retrait du dicarboxamide dans des vignobles de la région de Champagne (Staub 1991), moins de trois ans après l'arrêt d'utilisation simultanée des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) et des inhibiteurs externes de la Quinone (QoI) pour des souches multirésistantes dans des vergers en Grèce (Veloukas et al., 2014) et une réduction presque totale des souches mutantes de *Pyricularia oryzae* cinq ans après le retrait des inhibiteurs de la biosynthèse de la mélanine déshydratase (MBI-D) (Suzuki et al., 2010). Puisque les fongicides sont seulement appliqués durant la saison de croissance, Walker et al., (2017) ont mis en lumière que la réduction de la fréquence de certains phénotypes associés à la résistance, tels que MDR1, était moins prononcée lorsque l'échantillonnage était effectué à l'automne qu'au printemps suivant. Cela peut s'expliquer par l'existence d'un coût d'adaptation associé à des fonctions biologiques affectant la survie durant l'hiver. Ainsi, on mesure une fréquence d'allèles mutantes plus basse au sortir de l'hiver qu'après une saison complète de production à sélectionner en faveur des souches résistantes. En revanche, plusieurs études n'ont pas observé de baisse dans la fréquence de souches résistantes après le retrait des produits associés (Walker et al., 2013; Cosseboom et al., 2020). La multitude de produits utilisés, souvent dans des mélanges de fongicides, complique l'étude des coûts d'adaptation *in situ*, sans compter les autres effets, tels que la migration des souches et la résistance croisée (Mernke et al., 2011; Walker et al., 2017). Le type de techniques d'échantillonnage ainsi que le nombre d'échantillons prélevés peuvent aussi avoir un impact sur l'estimation de la proportion d'isolats mutants (résistants) au sein d'une population (Van der Heyden et al., 2014).

L'étude des coûts d'adaptation est un aspect incontournable dans la mise en place de stratégies anti-résistance pour plusieurs agents pathogènes importants (Hawkings and Fraaije 2018). Ainsi, bien qu'une plus grande vigilance et suivi de la résistance au sein de la population d'agents pathogènes est souhaitable pour assurer une meilleure gestion des maladies et de l'environnement, un faible coût d'adaptation pour les individus résistants va de pair avec une inquiétude accrue quant au risque de persistance de la résistance. On peut en étudier des paramètres spécifiques en conditions contrôlées *in vitro* ou *in vivo*, ou étudier les dynamiques

de population à travers une approche *in situ*. Cette dernière, bien qu'elle nécessite une bonne compréhension des mécanismes de résistance et de la biologie de l'agent pathogène, prend en compte toutes les variations génétiques à l'intérieur de la population. Le développement des techniques et des outils génomiques de détection de la résistance aux fongicides en temps réel offre des avenues intéressantes pour le futur de l'étude *in situ* des coûts d'adaptation (Radhakrishnan et al., 2019).

#### 1.2.6 Maladies causées par les espèces du genre *Botrytis* dans l'oignon

Tel que mentionné dans l'introduction, un contrôle efficace de la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon passe aussi par une étude approfondie des agents causaux. La prochaine section explore l'impact potentiel des infections mixtes dans le développement de la maladie.

*Botrytis squamosa* est largement documenté comme étant l'agent causal de la brûlure de la feuille de l'oignon (Carisse et al., 2011, Hickman and Ashworth 1943). Par contre, *B. squamosa* n'est pas la seule espèce du genre *Botrytis* à pouvoir attaquer les oignons et causer des maladies dans cette culture. En effet, deux autres maladies peuvent être causées par un complexe d'autres espèces du genre *Botrytis* : la pourriture du col et la brûlure des fleurs de l'oignon (Stentjes et al., 2021b).

La première est une maladie dite « post-récolte » et donc qu'on observe soit au moment de la récolte, mais plus souvent qui se développe lorsque les bulbes sont entreposés sur une plus longue période (Maude et Presly 1977). Elle est caractérisée par le ramollissement et une teinte brunâtre à la hauteur du col de l'oignon en plus d'observer épisodiquement la présence de mycélium grisâtre et de conidies à la surface du bulbe (Lorbeer et al. 2007). Plusieurs champignons phytopathogènes appartenant au genre *Botrytis* peuvent causer la maladie de la pourriture du col, soit *B. allii* et *B. aclada* et dans une moindre mesure *B. byssoidea* (Stentjes et al 2021b; Chilvers et du Toit 2006). Comme l'expliquent Stentjes et al., (2021b), les noms des deux principaux agents causaux étaient utilisés de façon interchangeable avant 2003, car c'est à cette époque que Yohalem et al., (2003) ont identifié que *B. allii* compterait 32

chromosomes (au lieu de 16 comme les autres espèces du genre *Botrytis*) et serait le produit d'hybridation entre une espèce du genre *Botrytis* à 16 chromosomes et *B. byssoidea*.

La seconde maladie, la brûlure des fleurs, est causée par un complexe principal de quatre espèces : *B. squamosa*, *B. alli*, *B. aclada* et *B. cinerea*. Dans une moindre mesure, *B. byssoidea* et *B. porri* peuvent aussi causer cette maladie et ont déjà été isolés à partir de plants symptomatiques (Steentjet et al., 2021b). La maladie est associée à de petites lésions autour de la hampe florale qui peuvent mener à la chlorose de la hampe et des graines. La maladie peut, par la suite, se propager à travers les semences (Steentjes et al., 2021b; Chlivers et du Toit 2006). Les symptômes de la brûlure des fleurs s'apparentent plus à ceux de la brûlure de la feuille causée par *B. squamosa* qu'à d'autres maladies comme la pourriture grise causée par *B. cinerea* dans d'autres cultures.

La multitude d'espèces pouvant causer une même maladie ouvre des portes intéressantes quant à l'étude des infections mixtes dans un pathosystème donné. En phytopathologie, l'étude des infections mixtes a historiquement été freinée par des défis méthodologiques. On pense notamment aux limitations qu'implique l'identification d'agents pathogènes basée sur la symptomatologie (Tollenaere et al., 2016). Les études récentes en la matière démontrent que les co-infections sont plus fréquentes que précédemment répertoriées (López-Villavicencio et al., 2011) et peuvent mener au développement de symptômes plus sévères dans certains pathosystèmes (Whitelaw-Weckert et al., 2013). La co-infection soulève plusieurs questions importantes, notamment sur l'étiologie et l'épidémiologie des différentes espèces impliquées (Susi et al., 2015), mais aussi sur les méthodes de détection et de dépistages utilisées pour prendre des décisions associées au contrôle des maladies. Les outils d'aide à la décision en phytoprotection utilisés dans la production d'oignons sont basés sur la détection et la quantification de certains champignons phytopathogènes clés. Par exemple, l'estimation du risque d'infection pour la brûlure des feuilles de l'oignon est basée sur *B. squamosa* uniquement (Van der Heyden et al., 2012). Il est intéressant de se demander si l'inclusion d'autres espèces du genre *Botrytis* dans l'évaluation des risques de maladie associée à ce genre permettrait une modélisation plus précise des maladies. Par contre, pour se faire il est impératif de mieux

comprendre comment les pathogènes interagissent individuellement entre eux dans le pathosystème (Susi et al., 2015).

### 1.3 Objectifs

L'essentiel du projet était orienté de façon à répondre aux questions suivantes: la résistance aux fongicides induit-elle une baisse de l'agressivité chez *B. squamosa*? Les co-infections par différentes espèces du genre *Botrytis* augmentent-elles la sévérité des symptômes de brûlure de la feuille?

*Hypothèses de travail : (a) la résistance aux fongicides induit une baisse d'agressivité chez B. squamosa (b) la présence de B. cinerea en co-infection avec B. squamosa augmente la sévérité des symptômes de brûlure de la feuille.*

Pour répondre à ces questions, trois objectifs ont été poursuivis:

(1) Déterminer la sensibilité des isolats de *B. squamosa* aux huit matières actives homologuées suivantes: boscalid, pyraclostrobine, picoxystrobine, pyriméthanil, fluopyram, fluxapyroxade, fludioxonil, difénoconazole.

(H1) *La croissance des isolats diminuera avec l'augmentation de la dose de fongicide utilisée en suivant un modèle de décroissance log-logistique.*

(2) Évaluer l'influence de la résistance sur l'habileté des isolats de *B. squamosa* à causer des lésions sur des plants d'oignons.

(H2) *Il y a une corrélation négative entre le nombre de matières actives pour lequel un isolat est résistant et son habileté à causer des lésions sur les plants d'oignons.*

(3) Évaluer la capacité des isolats de *B. cinerea* à causer ou amplifier des symptômes de brûlure de la feuille sur des plants d'oignons en l'absence et en présence de *B. squamosa*.

(H3) *En présence de B. squamosa, B. cinerea amplifiera les symptômes de brûlure en comparaison avec les traitements contenant B. squamosa uniquement.*





## CHAPITRE 2

### VARIATIONS IN FUNGICIDE RESISTANCE PROFILES DO NOT IMPAIR LESION PRODUCTION IN *BOTRYTIS SQUAMOSA*

#### 2.1 Résumé

La lutte contre les maladies fongiques est un des défis les plus importants dans la production d'oignons au Canada. Le champignon phytopathogène *Botrytis squamosa* est l'agent causal de la brûlure de la feuille de l'oignon et est une espèce clé dans les programmes d'applications de fongicides. Pour contrôler la maladie, les producteurs utilisent principalement des fongicides unisites, bien qu'ils représentent un plus grand risque pour le développement de la résistance aux fongicides. Qui plus est, l'effet du niveau de résistance à un ou plusieurs fongicides sur différentes aptitudes phénotypiques telles que la capacité à causer des lésions (CCL) sur des plants d'oignons est encore inconnu. Dans cette étude, la sensibilité de 90 isolats de *B. squamosa* à huit matières actives homologuées pour lutter contre la brûlure de la feuille de l'oignon a été évaluée en utilisant une méthode de croissance *in vitro* en milieu liquide. Basée sur un facteur de résistance supérieur à 2, l'incidence de la résistance était de 82.9% pour le boscalid, 79.5% pour le difénoconazole, 4.6% pour le fludioxonil, 78.4% pour le fluopyram, 79.3% pour le fluxapyroxade, 75.6% pour la picoxystrobine, 60.9% pour la pyraclostrobine et 39.1% pour le pyriméthanil. Parmi ces isolats, 59 ont aussi été évalués pour leur capacité à causer des lésions sur les plants d'oignons. Pour chaque matière active individuellement, aucun effet du niveau de résistance n'a été observé sur la CCL. Parallèlement, aucun n'effet sur la CCL n'a été observé en fonction du nombre de matières actives auxquelles un isolat était résistant. Ainsi, dans les conditions environnementales dans lesquelles cette étude a été réalisée, le niveau de résistance aux fongicides d'isolats de *B. squamosa* n'a pas affecté leur capacité à causer des lésions sur des plants d'oignons.

## **2.2 Portée de l'article et contributions respectives des auteurs**

La résistance aux fongicides est un problème d'envergure en agriculture pour lequel peu de solutions éprouvées existent. Afin d'offrir aux producteurs des moyens de luttés efficaces et adaptés à la réalité des agents pathogènes, il faut monitorer l'évolution de la résistance aux fongicides et évaluer dans quelle mesure il serait possible d'utiliser les fongicides de façon durable. En ce sens, la présente étude offre un aperçu des niveaux actuels de résistance aux fongicides chez le champignon phytopathogène *B. squamosa*, mais aussi permet d'approfondir les connaissances en matière de coûts d'adaptation associés à la résistance aux fongicides. Ces connaissances pourront, à terme, influencer les stratégies de gestion de la résistance aux fongicides dans les cultures d'oignons.

La contribution des différents auteurs a été répartie de la façon suivante : la conceptualisation de l'étude a été réalisée par Marie Poulin-Ouellette et Odile Carisse, Hervé Van der Heyden et Kamal Bouarab ont agi de façon importante à titre de conseillers; les travaux ont été réalisés par Marie Poulin-Ouellette; les analyses statistiques ont été effectuées par Marie Poulin-Ouellette et révisées par Odile Carisse et Hervé Van der Heyden; la version initiale du manuscrit a été rédigée par Marie Poulin-Ouellette puis révisée et corrigée par Kamal Bouarab, Odile Carisse et Hervé van der Heyden.

**VARIATIONS IN FUNGICIDE RESISTANCE PROFILES DO NOT IMPAIR LESION  
PRODUCTION IN *BOTRYTIS SQUAMOSA***

*Journal visé : Plant Disease*  
*L'article n'a pas encore été soumis pour publication.*

Marie Poulin-Ouellette<sup>1,3</sup>, Hervé Van der Heyden<sup>2</sup>, Kamal Bouarab<sup>3</sup> and Odile Carisse<sup>1\*</sup>,

<sup>1</sup> Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, J3B 3E6, Canada,

<sup>2</sup> Cie de recherche Phytodata, Sherrington, QC, J0L 2N0, Canada

<sup>3</sup> Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

\*Correspondance e-mail: [odile.carisse@canada.ca](mailto:odile.carisse@canada.ca)

## 2.3 Abstract

Plant protection against fungal diseases is one of the main challenges in onion production in Canada. The plant pathogenic fungi *Botrytis squamosa* is the causal agent of onion leaf blight (OLB) and is a key pathogen in fungicide programs. To control OLB, producers rely mostly on single-site fungicides even though those fungicides represent a high risk for fungicide resistance. Furthermore, the effect of resistance levels on fitness parameters such as lesion production is still unknown. In the present study, the sensitivity of 90 isolates of *B. squamosa* to eight active ingredients registered for use on onions were evaluated using an in vitro microtitier growth assay. Based on resistance factors greater than 2, the incidence of resistance measured was 82.9% for boscalid, 79.5% for difenoconazole, 4.6% for fludioxonil, 78.4% for fluopyram, 79.3% for fluxapyroxad, 75.6% for picoxystrobin, 60.9% for pyraclostrobin and 39.1% for pyrimethanil. Of those isolates, 59 were also evaluated for their capacity to cause lesions (CCL) on live onion plants. For individual active ingredients, no effect of resistance status on CCL was observed ( $P > 0.05$ ). Similarly, no effect on CCL of the number of active ingredients to which an isolate is considered resistant was observed ( $P > 0.05$ ). It was concluded that fungicide resistance levels in *B. squamosa* do not impair capacity to cause lesions on onion plants.

Keywords: fungicide resistance, fitness cost, onion leaf blight

## 2.2 Introduction

In eastern Canada, agriculture in black muck soils is highly specialized and centered around three high-value crops: onions, carrots, and lettuce. Among those, onion production requires the longest growing season; hence plant protection is an important concern for growers. Epidemics of three important airborne diseases can be observed: onion downy mildew, stemphylium leaf blight and onion leaf blight (OLB). Rising yield loss can be linked the first two diseases, however, OLB is the key disease in scheduling fungicide applications in onion production (Carisse et al., 2011; Van der Heyden et al., 2020; Hay et al., 2019).

OLB is a polycyclic disease caused by the plant pathogenic Ascomycete *Botrytis squamosa* (Walker 1925a). *Botrytis squamosa* overwinters as sclerotia or mycelium in cull piles or the soil. In the spring, it can reproduce sexually by forming ascospores but mostly asexually by forming conidia on sclerotia (Ellerbrock et Lorbeer 1977). *B. squamosa* conidia can also germinate from diseased leaves and infect healthy tissues multiple times during the growing season (Hancock et Lorbeer 1963).

Although integrated management approaches, including the use of bio-fungicides, crop rotation, and reduced planting densities can be used to prevent disease development, market structures, limited varietal options, and lack of commercially acceptable biological control agents require onion producers to rely primarily on fungicides to mitigate disease development (Carisse et al., 2006; Steentjes et al., 2021b). In the last 20 years, fungicides available for growers have changed significantly. Traditionally in eastern Canada, broad-spectrum multisite fungicides, such as chloronitriles (FRAC M5) and dithiocarbamates (FRAC M3) or older generations of single-site fungicides, such as benzimidazole (FRAC 1) and dicarboximides (FRAC 2), were used to control OLB (Carisse et al., 2011). However, most of these fungicides' registrations have been or will soon be revoked due to concerns regarding higher health and environmental hazards (Runkle et al., 2017; PMRA 2022). Hence, this situation increased the reliance on single-site fungicides to control OLB (Gossen et al., 2014). Nowadays, carboxamides (FRAC 7) and quinone outside inhibitors (FRAC 11) are frequently used, but registered fungicides also contain demethylation inhibitors (FRAC 3), anilinopyrimidine (FRAC 9), phenylpyroles (FRAC 12) and uncoupler of oxidative phosphorylation (FRAC 29). Single-site fungicides represent a greater risk for resistance development because of the rapid development of single nucleotide substitutions (or indels), which can cause a shift in fungicide susceptibility for many fungal pathogens (Mair et al., 2016).

*Botrytis squamosa* has received limited attention concerning fungicide resistance, while the few studies that have addressed it focused primarily on resistance to iprodione, a product that is no longer registered for use in onions production in Canada (Tremblay et al., 2003; Carisse and Tremblay 2007; Van der Heyden 2014). As a result, mutations associated with fungicide resistance in *B. squamosa* have yet to be identified, thus limiting the methods available to

evaluate fungicide resistance for this fungus. However, the closely related plant pathogen *B. cinerea* has been studied extensively in recent years. Findings for *B. cinerea* suggest high levels of resistance for many products that are currently used in onion production, stressing the need for fungicide resistance assessment in *B. squamosa* populations (Amiri et al., 2013; Cosseboom and Hu 2021; Weber and Hahn 2019; Kozhar et al., 2020; Walker et al., 2013).

Fungicide resistance evaluation should be comprehensive to encompass the impact of resistance on disease management. However, across fungal plant pathogens, linking fungicide resistance to disease management strategies is not a simple task (Mikaberidze and Macdonald 2015; Elderfield et al., 2018; Kohzar et al., 2020). This can partly be explained by the lack of knowledge regarding fungicide resistance's impact on the fungus itself (Billard et al., 2011; Chen et al., 2016; Walker et al., 2017; Hawkins and Fraaije, 2018). Therefore, in addition to knowing the resistance status of the target fungal populations, it is also essential to understand the fitness cost associated with fungicide resistance to implement effective anti-resistance strategy and cope with existing levels of resistance (R4P network 2021). The primary strategy advocated to prevent the development of fungicide resistance is typically mixtures. Hence, using multisite fungicides such as dithiocarbamates in tank mixes with single-site fungicides would permit an efficient control of diseases without selecting fungicide-resistant strains (Russel 2005; Hobbelen et al., 2011; Mikaberidze et al., 2013; Elderfield et al., 2018). Other strategies, such as rotation between fungicides with different modes of action or alternation of fields treated with specific fungicides, are accepted as good practice in fungicide resistance management (Elderfield et al., 2018; Brent et Hollomond 2007). However, both strategies are based on the assumption that fungal strains resistant to fungicides are less performant than sensitive strains without selection pressure exerted by using fungicides (Mikaberidze et al., 2013). In practice, a fitness cost associated with fungicide resistance has yet to be measured for many fungal pathogens and fungicides (Hawkings et Fraaije 2018; Allen et al., 2017). Hence, exploring possible fitness costs associated with fungicide resistance in plant pathogenic fungi is essential in understanding the impact of fungicide resistance on disease management.

Studies on fitness costs associated with fungicide resistance have focused mostly on resistance to single molecules (Hagerty et al., 2017; Billard et al., 2012; Raposo et al., 2000). However,

it has been shown that populations exposed to fungicides develop multiple resistance profiles, and it is not expected that *B. squamosa* will be any different. Thus, the following question arises: What is the impact of resistance to multiple fungicides in *B. squamosa* on fitness parameters such as the capacity to cause lesions on onion leaves? In other words, is there a fitness cost (expressed as reduced capacity to cause lesions on onion leaves) in *B. squamosa* associated with multiple fungicides resistance? Thus, this research aimed to address this question with two objectives: (1) to characterize *B. squamosa* isolates for sensitivity to eight fungicides registered for use in onions and (2) to assess the capacity of *B. squamosa* isolates to cause lesions on onion plants. This study is a first step towards understanding the impact of multiple resistance on lesion production in OLB.

## **2.3 Materials and methods**

### *2.3.1 Isolates collection*

In late summer 2020, 10 samples per field were collected from 13 dry onion or shallot fields grown in black muck soils in the Jardins de Napierville MRC area of Quebec, Canada. In 2015, one sample per field was also collected from 10 dry onion or shallot fields in the same region. Each sample consisted of approximately ten infected leaves. *Botrytis squamosa* was isolated from infected leaves using the method described in (Tremblay et al., 2003). This region is characterized by its intensive production of vegetable crops such as carrots, onions and lettuce. In brief, the onion leaves were cut into 2 cm pieces and put in a 9 cm Petri dish on two humidified filter papers. The dishes were left at room temperature (18°C to 23°C) under natural light to favour sporulation for 48h to 72h. Conidia were harvested separately from individual sporulating lesions using a sterile swab (BD, Brescia, Italy). Conidia on swabs were transferred on culture media by gently spreading them on the surface of potato dextrose agar (39 g/L of potato dextrose agar (PDA) (BD) containing 0.1 g/L of novobiocin (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, United States) and incubated at room temperature for 48h to 72h. Based on visual identification, individual colonies of *Botrytis spp.* were subcultured onto a Petri dish containing PDA and incubated at room temperature for 5 to 7 days. For long-term conservation of live

isolates, a mycelial plug was left to colonize a 1.5 ml Eppendorf tube (Progene (Ultident Scientific), Montreal, Quebec, Canada) containing sterile soil (Promix (PremierTech), Rivière-du-Loup, Québec, Canada) for 72h at room temperature and then stored at 4°C.

### 2.3.2 Confirmation of *Botrytis squamosa* isolates' identity using qPCR assay

To confirm that the isolates belong to the specie *B. squamosa*, qPCR assays using primers specific to *B. squamosa* (Carisse et al., 2009) were performed on 230 *Botrytis* spp collected in 2020. Mycelium was harvested and DNA was obtained using the FastDNA SPIN kit (MP Biomedicals, Santa Ana, California, United States) and stored at - 20°C until use. Then, DNA was adjusted to 1 ng/μL, and qPCR was performed with reagents from the ECO master mix (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, United States) in a QuantStudio 3 instrument ((Thermo Fisher) as described in Van der Heyden (2020). To minimize the error associated with sampling year, ten collection isolates harvested in 2015 following the same protocol were also included in this study.

### 2.3.3 Isolate rejuvenation and spore production

*B. squamosa* produces few conidia from mycelium on culture media compared to *B. cinerea* and most arise from sclerotia. To ensure a sufficient and uniform harvest of viable conidia across isolates, all isolates used in the experiment were first cultured on fresh onion media. Small pieces (<0.1 g) of sterile soil colonized by *B. squamosa* mycelia from the mycotheque tubes were placed on a Petri dish containing an onion extract agar (15 g/L of dried onion leaves, 12.5g/L of Agar (BD), 0.1 g/L of novobiocin. A sterile 5 cm green onion leaf was placed over the small soil pieces before incubating the Petri dish in the dark at 18°C for 5 to 7 days. Next, five 5 mm plugs colonized with mycelium were subcultured from each isolate onto 5 PDA (39 g/L) plates and incubated in the dark at 18°C for five weeks until mature sclerotia formation. Five-week-old sclerotia were harvested using tweezers from mono-colony isolates of *B. squamosa* growing on PDA and placed into a sterile 9 cm empty Petri dish. Sclerotia



were then surface sterilized for two minutes using 10 ml of 1% sodium hypochlorite solution (dilution from Lavo 6) (Montreal, Quebec, Canada) and rinsed for 2 minutes with 10 ml of double-distilled water. Sclerotia were then transferred to a Petri dish containing a layer of sterile cotton wool soaked with 10 to 15 ml of autoclaved double distilled water and a double layer of sterile filter paper to maintain high humidity throughout the sporulation process. Sealed Petri dishes were incubated for 10 to 20 days under blacklight blue UVA lights (F17T8-BLB) (Normand Lamps, Saint-Charles, Illinois, United States) using a 18h photoperiod at 15°C until near maximal conidiophore formation was observed. To harvest and conserve *B. squamosa* conidia, sporulating sclerotia were harvested using tweezers and dropped into 50 ml falcons containing 15 ml of 5% glycerol solution (Sigma-Aldrich). Falcons were vortexed for 2 minutes before measuring the conidial concentration using a hemacytometer (inCyto, Ipjangmyeon, Seobuk-gu, Cheonan, Chungcheongnam-do, South Korea).  $10^5$  conidia/ml suspensions were made by collecting a portion of the initial conidial suspensions using a 1 ml micropipette and diluting it in a 5% glycerol solution. Conidial suspensions were conserved at -20°C for up to 6 months. In total, over the 97 isolates (87 from 2020 and 10 from 2015) that went through the process of producing conidia, 90 of them produced enough inoculum to be tested for the fungicide resistance assay.

#### 2.3.4 Sensitivity of *B. squamosa* isolates to fungicides

The sensitivity of 90 isolates of *B. squamosa* to eight active ingredients was estimated using an in vitro sensitivity assay using a microtiter method in 96-well plates (VWR, Radnor, Pennsylvania, United States). Using microtiter method to measure growth allowed to test a high number of isolates to a relatively high number of active ingredients in a shorter amount of time than using a radial growth method (Stammler and Speakman 2006; Tremblay et al., 2003). Pure active ingredients used in eight fungicides registered for use on onions in Canada, namely boscalid, fluopyram, fludioxonil, fluxapyroxad, difenoconazole, pyraclostrobin, picoxytrobin and pyrimethanil (Sigma-Aldrich) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) to achieve a concentration of 10,000 ppm. Further 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm,

0.1 ppm, and 0.01 ppm solutions were obtained through 10-fold serial dilutions using autoclaved double-distilled water. Conidial suspensions were made by diluting previously described conidial stock solutions ( $10^5$  spores/ml in 5% glycerol) in 48 g/L potato dextrose broth (BD) to a  $2 \times 10^4$  conidia/ml concentration. A total of 18 96-well plates were used to test all isolates for sensitivity to one active ingredient at once. Each plate fitted five isolates as three wells per active ingredient concentration per isolate were used as replicates. Each well was filled with 50  $\mu$ L of the active ingredient solution and 50  $\mu$ L of conidial solution. Wells containing no conidia for each active ingredient concentration were used as negative controls on every plate. Plates were shaken for 60 seconds, and absorbance was read at 405 nm in a spectrophotometer (Biotek, Winooski, Vermont, United States). Plates were then covered and sealed with parafilm (Bemis, Sheboygan Falls, Wisconsin, United States) and incubated at 18°C in the dark for 72h before being reread at 405 nm. The resulting growth was calculated as the difference between final absorbance and fungicide turbidity given by the absorbance of negative control wells. Three isolates that exhibited no growth in the absence of fungicides were excluded from the analysis.

### *2.3.5 Capacity to cause lesions of B. squamosa isolates*

Of the 90 isolates evaluated for fungicide sensitivity, 59 *B. squamosa* isolates were evaluated for their capacity to cause lesions on onion plants. Only the isolates that produced more than  $5 \times 10^5$  conidia/ml were tested. Following a modified version of the method described in Carisse and Tremblay (2007), onion seeds (cv. “Cartier”) were planted in 36 cell plug trays in Promix soil and raised in a growth chamber (Convion, Winnipeg, Manitoba, Canada) at 20°C, 70 % relative humidity (RH) and with a 16-hour photoperiod provided by incandescent and luminescent light bulbs during five weeks or until the onions reached the four or five leaf stage. Individual plug tray cells were cut out and placed in an inoculation cylinder in a 4-inch plate filled with 70 ml of water to ensure proper irrigation during the experiment. The cylinders were covered with a perforated removable lid.

Conidial suspensions were made by diluting previously described conidial stock suspensions ( $10^5$  spores/ml in 5% glycerol) with a 5% glycerol solution to achieve a  $7.5 \times 10^4$  spores/ml concentration. The conidial germination rate for each isolate was calculated by spreading 100  $\mu$ L of conidial suspension using a micropipette and a cell spreader on water agar (15g/L) and comparing the number of germinated conidia (over 100 conidia) initially and after 24h incubation at room temperature using a reverse microscope. Each solution was divided into five 1.5 ml Eppendorf tubes containing 0.75 ml of solution each. Eppendorf tubes filled with 5% glycerol solution were used as a negative control. To ensure uniformity and reproducibility throughout the experiment, the same isolate (isolate “60.2”) was repeated at every experimental run and used as a positive control. Conidial solution divided into 0.75 ml tubes was sprayed in an inoculation tower onto one four or five-leaf stage onion using an airbrush sprayer (Sparmax, Taipei, Taiwan) with a constant pressure of 170 kPa. Two-centimeter pieces of tape were used to cover the perforation on the lid of the inoculation tower. The cover guaranteed a 100% RH during the infection period. The five replicates for each isolate were inoculated onto onions before the sprayer was rinsed with 20 ml of a 5% glycerol solution. Following a randomized complete block design, towers were placed in an incubation chamber set at 20°C, 100% RH, and a 10h photoperiod allowing for spore germination before removing the lids. Inoculated plants were further kept in the growth chamber at 18°C, 75% RH, and a 10h photoperiod for 72h. After the incubation period, lesions were counted on the second leaf and projected on the total leaf surface area to achieve a “number of lesions per square centimetre” for each replicate. The number of lesions per square centimetre of onion leaves was then adjusted for the isolates’ germination rate and used as our measure of the “capacity to cause lesions” (CCL). Six isolates with a 0% germination rate were excluded from the analysis.

### 2.3.6 Statistical analysis

First, the relative half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) of the 90 isolates of *B. squamosa* was calculated by adjusting non-linear functions to mean growth data (*MG*) over

the three replicates against the log of the concentrations tested (0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 ppm) separately for each of the eight active ingredients. Functions were chosen according to the following criteria: 1) the same function could be used to describe all the isolates within an active ingredient for  $EC_{50}$  to be comparable; 2) models should converge; 3) highest proportion of model parameters should be significant ( $p < 0.05$ ). The following functions were tested on all 90 isolates: log-logistic, Weibull, Brain-Cousens, linear regression, exponential decay and Michaelis-Menten. Exponential decay functions with two or three parameters were chosen as they fit mean growth data best (eq 1).

$$MG = c + (d - c)(\exp(-x/e)) \quad \text{eq 2.1}$$

Where  $MG$  is the mean growth,  $c$  describes the final plateau,  $d$  is the non-inhibited growth, and  $e$  is the slope of the curve. In the two parameters exponential decay function, the final plateau ( $c$ ) equals 0.

The "drm" function from the "drc" R package (Ritz et al. 2015) was used to fit the non-linear models to in vitro fungicide sensitivity growth assay data points. The data used in the function consisted of the growth data of three replicates per fungicide concentration per isolate. The two parameters exponential decay function (EXD.2) was used to describe data from boscalid, pyraclostrobin, difenoconazole, fludioxonil, and pyrimethanil experiments. The three parameters exponential decay function (EXD.3) was used to describe data from picoxystrobin, fluopyram, and fluxapyroxade experiments. Fungicide concentrations associated with 50% growth were estimated using the "ED" function in the "drc" package as described by Noel et al. (2018).

Second, continuous  $EC_{50}$  values were separated into categories to give biological significance to data and to allow resistance levels to be compared across active ingredients. Isolates' resistance status, either "sensitive", "resistant" or "very resistant", were established based on the resistance factor (RF) values. Considering no baseline could be retrieved from literature, the average ten lowest  $EC_{50}$  values for an active ingredient were used to establish a pseudo-baseline. Isolates' RFs were calculated as a ratio of the  $EC_{50}$  and the pseudo-baseline for a

given active ingredient. Isolates with RF greater than 2 were deemed "resistant" and isolates with RF factor greater than 10 were deemed "very resistant" (Leroux et al., 2010).

Third, continuous CCL data was transformed into categorical data to enable a biological interpretation of the results. To do so, hierarchical clustering was performed to segregate *B. squamosa* isolates according to the number of lesions caused on leaves. Analysis of variance (ANOVA) performed on continuous CCL data confirmed that using mean lesions per square centimetre over the five replicates for an isolate was appropriate. A dissimilarity matrix of the Euclidian distances between mean lesions per square centimetres was produced using the base R function "dist" (R version 4.2.1). A cluster dendrogram using the average agglomeration method was then produced using the "hclust" function, separating isolates into three categories: low, medium or high capacity to cause lesions on onion leaves. Then, the distribution of EC<sub>50</sub> values within each category was evaluated to assess if distributions differed between categorical CCL data. Two-sample Kolmogorov-Smirnov tests were performed between "low" and "medium", "low" and "high", and "medium" and "high" capacity to cause lesions categories for every eight active ingredients tested.

Forth, to further evaluate the effect of resistance on CCL, the cumulative effect of resistance to multiple active ingredients was assessed. The "number of resistances" was calculated as the number of active ingredients to which an isolate is classified as "resistant" or "very resistant". The number of resistances ranged from 2 to 7 for a given isolate. Kruskal-Wallis test was used to evaluate the effect of the number of resistances on the continuous mean number of lesions per square centimetre of leaves.

## **2.4 Results**

In the present study, 90 of the 230 *Botrytis* spp. isolates recovered from diseased onion fields in Quebec province belonged to the specie *B. squamosa*. 86 isolates were retrieved during the summer of 2020 and 4 of them during the summer of 2015. Following an in vitro growth assay measuring the sensitivity to eight active ingredients, exponential decay functions were adjusted over mean growth data. For pyraclostrobin, picoxystrobin, pyrimethanil, fluxapyroxad,

difenoconazole, fludioxonil, and fluopyram, respectively 97%, 79%, 99%, 97%, 99%, 100% and 95% of model parameters were significant at  $P < 0.05$ . Model fit was not as good for boscalid (models did not converge), where isolates' sensitivity was clearly beyond the highest active material concentration tested (100 ppm).

Different sensitivity patterns were observed in the distribution of adjusted mean growth data curves over active ingredient concentrations (see examples in supplementary figures S1-S8). For pyraclostrobin, picoxystrobin, pyrimethanil, and fluxapyroxad, isolates were separated into two groups according to their sensitivity to the active ingredient. For difenoconazole and fludioxonil, sensitivity between isolates varied continuously over a shorter range of values. The sensitivity patterns were less obvious for fluopyram and boscalid where isolates appeared to be separated into multiple groups.

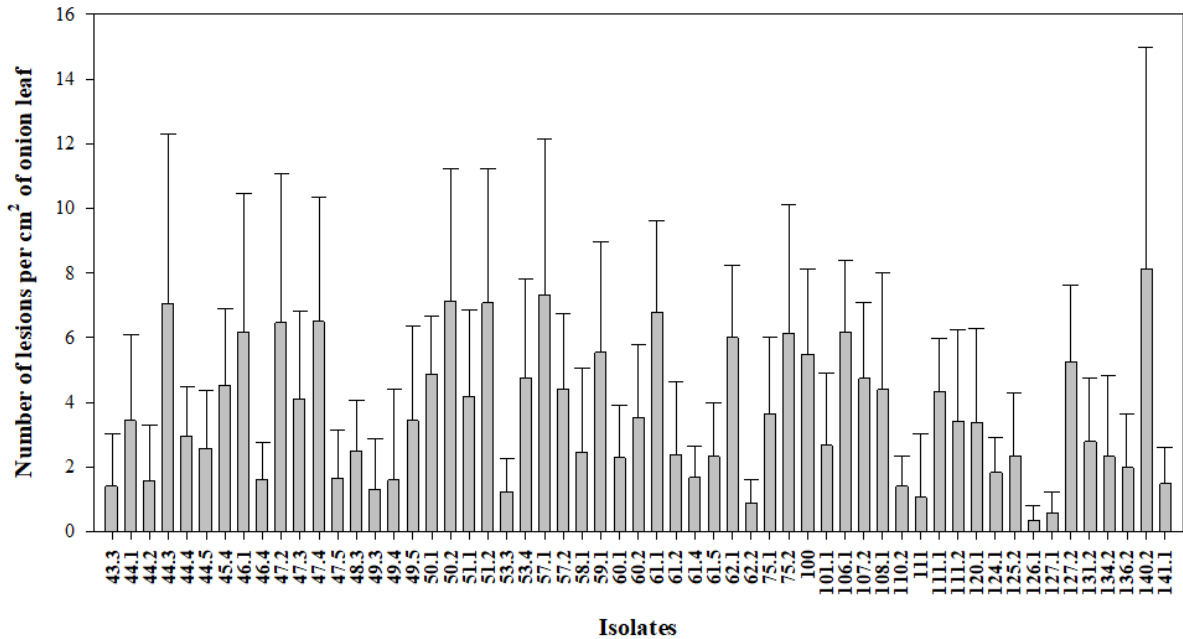
Depending on the active ingredient tested, the isolates exhibited a large or limited range of  $EC_{50}$  values. Overall, the resistance incidence (the % of isolates classified “resistant” or “very resistant”) was 82.9% for boscalid, 79.5% for difenoconazole, 4.6% for fludioxonil, 78.4% for fluopyram, 79.3% for fluxapyroxad, 75.6% for picoxystrobin, 60.9% for pyraclostrobin and 39.1% for pyrimethanil. The mean and range of  $EC_{50}$  values per active ingredient for the “sensitive”, “resistant”, and “very resistant” categories are listed in Table 2.1.

**Table 2.1: Mean and range of EC<sub>50</sub> values per resistance category in 87 *B. squamosa* isolates**

Fungicide	Mean EC <sub>50</sub> value (ppm) Sensitive	Range EC <sub>50</sub> Values Sensitive (RFs<2)	N =	Mean EC <sub>50</sub> value (ppm) Resistant	Range EC <sub>50</sub> Values Resistant (RFs >2& <10)	N =	Mean EC <sub>50</sub> value (ppm) Very Resistant	Range EC <sub>50</sub> Values Very Resistant (RFs>10)	N =
Boscalid	0.767	[0.504-1.100]	1 4	5.84	n/a	1	>100	[7.127->100]	67
Difenoconazole	0.062	[0.025-0.090]	1 8	0.21	[0.095-0.388]	6 9	n/a	n/a	0
Fludioxonil	0.026	[0.014-0.033]	8 3	0.036	[0.035-0.038]	4	n/a	n/a	0
Fluopyram	0.102	[0.008-0.141]	1 9	0.474	[0.155-0.740]	6 2	0.956	[0.810-1.593]	7
Fluxapyroxade	0.032	[0.001-0.048]	1 8	0.076	[0.053-0.186]	1 4	1.036	[0.267-4.353]	55
Picoxystrobin	0.075	[0.050-0.116]	2 1	0.369	[0.122-0.580]	2 6	2.334	[0.601-10.880]	39
Pyraclostrobin	0.1	[0.059-0.148]	3 4	0.57	[0.414-0.819]	5 2	0.83	n/a	1
Pyrimethanil	0.351	[0.146-0.492]	5 3	0.701	[0.496-1.207]	2 8	7.833	[3.841-15.175]	6

Table 2.1: Mean and range of EC<sub>50</sub> values for sensitive (RF<2), resistant (RF[2-10]) and very resistant (RF>10) *B. squamosa* isolates to eight active ingredients. A total of 87 isolates were tested where N = number of *B. squamosa* isolates belonging to each resistance category.

Capacity to cause lesions on live onion leaves differed between *B. squamosa* isolates (P<0.05) (see ANOVA table in supplementary table S1). Figure 2.1 illustrates the range of lesions per square centimetre of leaves cause by 59 *B. squamosa* isolates.

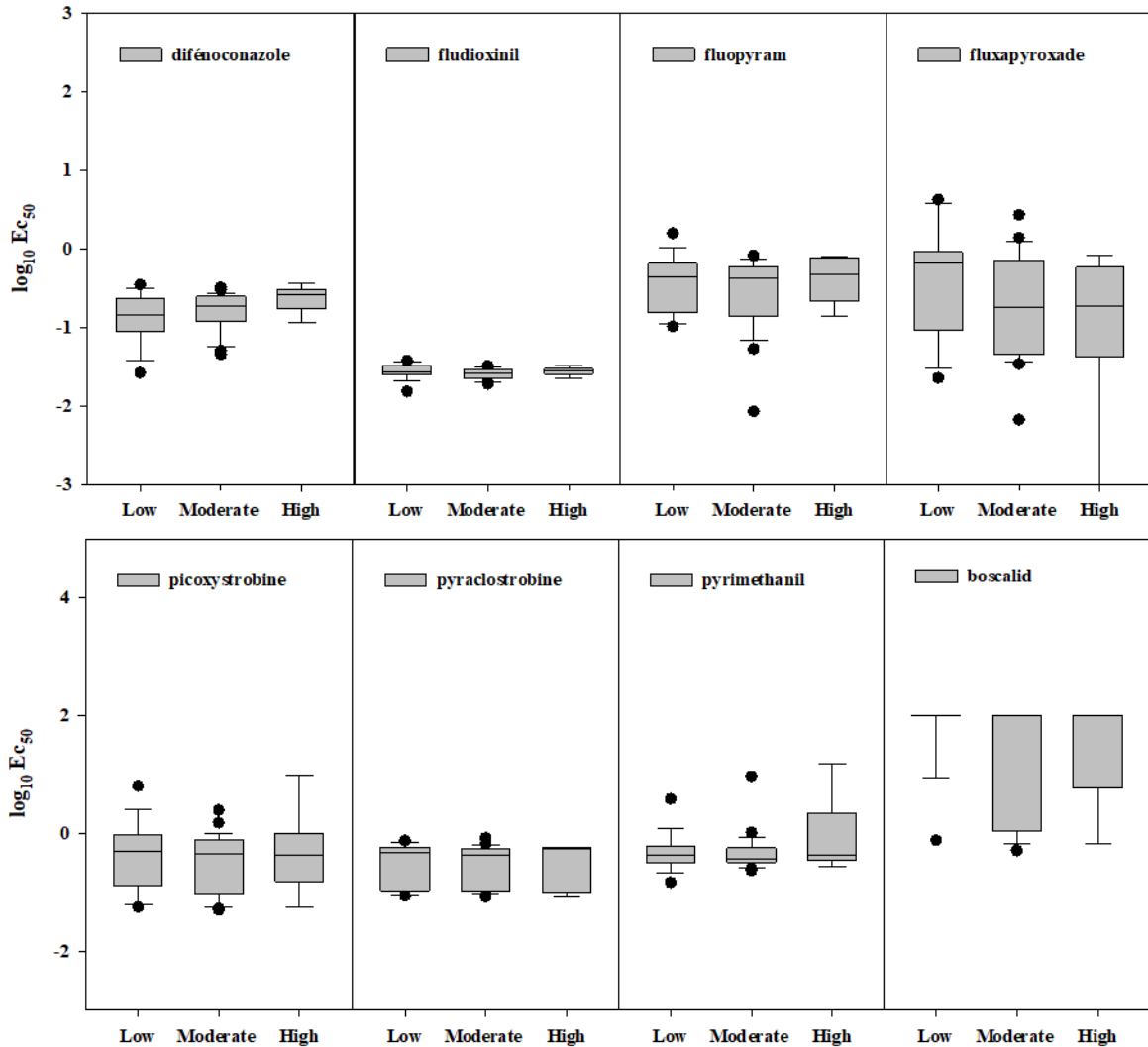


**Figure 2.1: Number of lesions per cm<sup>2</sup> of leaf for 59 *B. squamosa* isolates**

Aggressivity measured as capacity to cause lesion (CCL) of 59 *B. squamosa* isolates on onions plants at the 4-5 leaf stage conducted in growth chambers in a controlled environment. Experiments were run twice, with five replicates each time. The error bars represent the standard error on the number of lesions per cm<sup>2</sup> of onion leaf of every isolate tested.

Figure 2.2 shows the distribution of EC<sub>50</sub> values of 53 *B. squamosa* isolates for eight active ingredients according to their CCL. Isolates were separated into three categories ( $R^2 = 0.87$ ) based on their capacity to cause lesions. For each active ingredient, the distribution of EC<sub>50</sub> values does not differ between categories for each active ingredient, confirmed by nonsignificant P values ( $\alpha = 0.05$ ) for pairwise Kolmogorov-Smirnov tests.

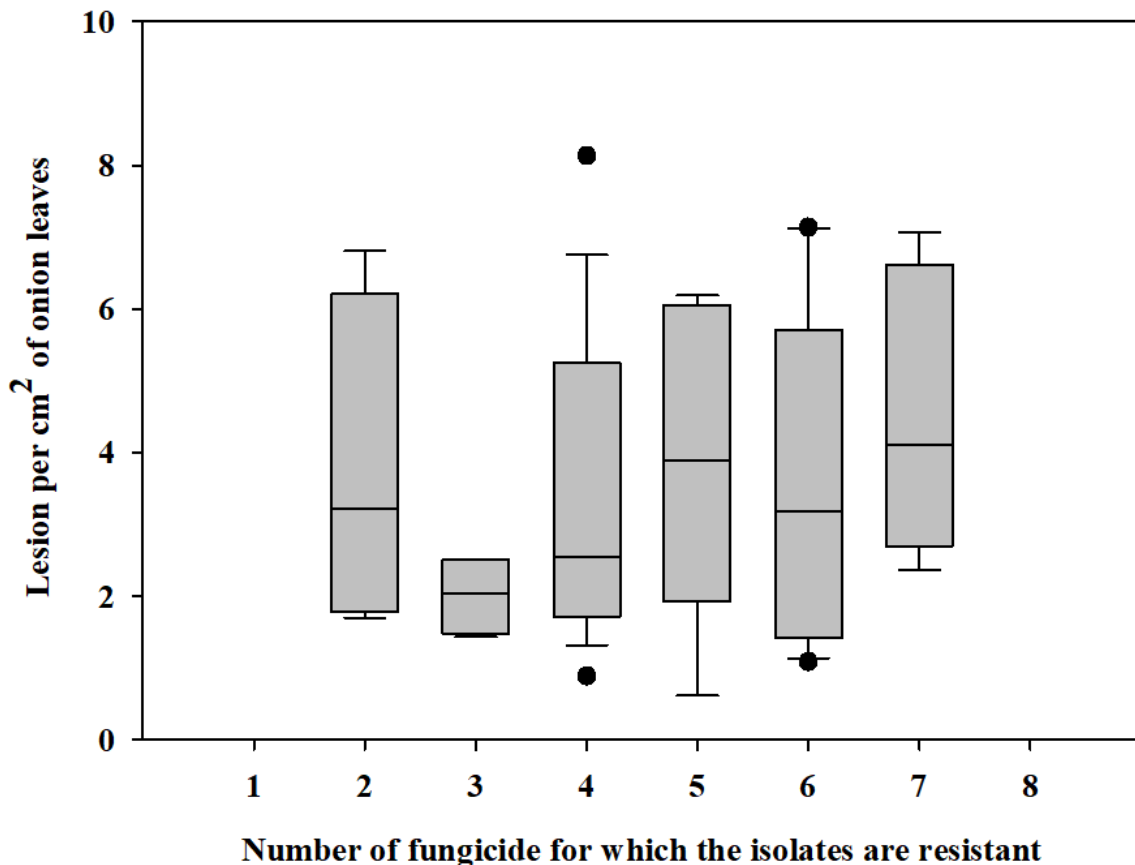




**Figure 2.2: Comparison of  $\log EC_{50}$  values for eight active ingredients between categories based on capacity to cause lesions for 53 *B. squamosa* isolates**

Distributions of  $\log$  of  $EC_{50}$  values of *B. squamosa* isolates to eight active ingredients with low (n= 30), moderate (n= 16) or high (n= 11) ability to cause lesions on onions plants.  $EC_{50}$  values were measured over 6 doses of fungicide (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) using in vitro sensitivity assay. Capacity to cause lesions on live onions experiments were conducted in growth chambers in a controlled environment.

The number of active ingredients to which an isolate is classified “resistant” or “very resistant” was used to evaluate the possible cumulative effect of multiple resistances on CCL. Figure 2.3 illustrates the effect of the number of resistances to eight active ingredients on CCL for 53 *B. squamosa* isolates. Kruskal-Wallis tests confirmed that the number of resistance did not have a significant effect ( $P > 0.05$ ) on the number of mean lesions per square centimetre of leaves.



**Figure 2.3: Effect of the number of resistances to eight active ingredients on the capacity of *B. squamosa* to cause lesions on onion leaves**

Distribution of number of lesions per square cm on onion leaves caused by *B. squamosa* isolates resistant to 2 (n= 4), 3 (n= 4), 4 (n=16), 5 (n= 6), 6 (n =16) or 7 (n= 6) active ingredients. The capacity to cause lesions was measured on live onions in a controlled environment. Resistance status of an isolate for an active ingredient was based on resistance factor (RF) greater than 2.

## 2.5 Discussion

In the present study, *B. squamosa* isolates were tested for their sensitivity to eight active ingredients in fungicides registered for use on onions in Canada. Few studies have examined fungicide resistance in *B. squamosa*, even though management of onion leaf blight (OLB) increasingly relies on single-site fungicides at high-risk for resistance development (Carisse et al., 2011). The last reports on fungicide resistance in *B. squamosa* date back to 2007 and 2014 and tested iprodione, a fungicide no longer registered in Canada (Carisse and Tremblay, 2007; Van der Heyden, 2014).

As expected, the distribution of EC<sub>50</sub> values within each fungicide is often non-normal (Amiri et al., 2013). Depending on the fungicide, multimodal distributions can be observed as well as continuous EC<sub>50</sub> distributions. For example, pyraclostrobin exhibits a bimodal distribution, suggesting a single amino acid substitution may cause the shift in susceptibility from sensitive to resistant, as in *Botrytis cinerea* and many other plant pathogenic fungi (Leroux et al., 2010). Alternatively, a more continuous distribution of EC<sub>50</sub> values, such as those observed for difenoconazole or fludioxonil, may suggest a different resistance mechanism. Overexpression of efflux pumps is known to be the primary mechanism of resistance to DMI fungicides for many ascomycetes (Hulvey et al., 2012; Weber and Hahn, 2011). As the number of efflux pumps varies, the amount of toxic material (fungicide) that can be expelled from the cell may also vary (Kretschmer et al., 2009). Further investigations are needed to establish the molecular basis of resistance in *B. squamosa* to the fungicides tested in this study.

The proportion of resistant isolates was found to be high for boscalid, difenoconazole, fluopyram, fluxapyroxade, picoxystrobin, and pyraclostrobin. However, though Van der Heyden et al., (2014) showed that, in regard to spatial distribution of single nucleotide polymorphism (SNPs), the high levels of resistance suggest that the number of isolates tested in this study allowed for a precise estimate of resistance (variation coefficients are around 20% for mean resistance over 50%), the short temporal period in which most of them were isolated prevents us from extrapolating these results to the entire *B. squamosa* population.

Nevertheless, the incidence of resistance observed here often follows trend comparable to what can be observed in other similar pathosystems. For example, mutations conferring resistance to azoxystrobin, a group 11 fungicide, was found in 88% of isolates of *S. vesicarium*, the causal agent of stemphyllium leaf blight, in onion fields in the state of New York (Hay et al., 2019). Similarly, a high proportion of resistance (66.7%) to pyraclostrobin in *B. cinerea* population was also found in strawberry fields in the Carolinas (Fernández-Ortuño et al., 2012). Again in strawberry fields, 59% of *B. cinerea* isolates were found to be resistant to boscalid in Denmark as well as lower resistance incidence for fludioxonil (21.2%) (Nielsen et al., 2021).

Overall, the information provided in this study is useful regarding the resistance status of *B. squamosa* and the possible loss of efficacy of certain fungicides to control OLB in the future. However, to comprehensively interpret resistance data and related fungicide management strategies, possible fitness costs associated with fungicide resistance must be examined. In this study, the CCL was used as a measurement of fitness. Though multiple fitness parameters could have been studied, such as spore production or winter survival (Lalève et al., 2014), conidial capacity to cause lesions on live onions was chosen as it is a critical fitness parameter in regard to *B. squamosa* life cycle and management of OLB (Carisse et al., 2008). In vivo assays were carried out in an optimal and controlled environment. Although a controlled environment limits the effects of variables outside the experimental design, it is also further away from the suboptimal and fluctuating natural field conditions and thus, limits the extrapolation of results to real life onion production.

In this study, no effect of resistance to eight active ingredients on the CCL was found. Furthermore, no effect was detected when the sensitivity of individual active ingredients was evaluated and when the number of active ingredients to which an isolate was resistant was assessed. Studies on fitness costs associated with fungicide resistance in ascomycetes sometimes have inconsistent results (Hawking and Fraaije 2018). The diversity of resistance mechanisms that can be studied partly explains why the comparison between studies is limited. For example, when looking at the competitive ability of *B. cinerea* isolates resistant to boscalid against wild types, Veloukas et al. (2014) found a significant reduction in the proportion of resistant isolates over multiple infection cycles. Those results contrast with the work of Rupp

et al. (2017), who found no competitive advantage of wild-type *B. cinerea* isolates over multiresistant ones in the same type of experiment, but evaluating different resistance mechanisms. Likewise, the variations in techniques used to test for fungicide resistance, the large number of fitness parameters that could be involved in fitness costs, and the difficulty of isolating the effect of one or multiple fungicides in field studies can explain the lack of consensus in the scientific community regarding the systematic existence of fitness costs (Amiri et al., 2020; Delmas et al., 2017; Ajouz et al., 2010; Billard et al., 2012; Chen et al., 2016; Hsiang et al., 1998; Molaei et al., 2020; Raposo et al., 2000; Scalliet al., 2012; Veloukas et al., 2014; Rupp et al., 2017; Mernke et al., 2011; Walker et al., 2017). However, studies working with isogenic lines such as the one published by Lalève et al. (2014) bring interesting results into the discussion. Indeed, by removing genetic background diversity from the equation, the unobvious nature of fitness costs associated with different fungicide resistances stand out. For example, strains resistant to boscalid might outcompete wild types in in vitro competitive assay, but the same strains might exhibit lower levels of pathogenicity. Hence, trying to project possible fitness costs onto real field situations is difficult. Nevertheless, most anti-resistance management strategies, such as rotation between modes of action or simultaneous use of low and high-risk fungicides are based on the fact that there is a fitness cost associated with fungicide resistance (Mikaberdidze et al., 2013). For example, when looking at rotation between modes of action, it is hypothesized that resistant strains are less performant than sensitive strains in the absence of selection pressure exerted by a certain fungicide spraying. By avoiding fungicide use in a field, the proliferation of sensitive strains is favoured at the expense of resistant strains (Eldfield et al., 2018). Thus, when the fungicide is reintroduced, its efficacy would be partially restored (Allan et al., 2017).

With respect to the conditions in which this experiment took place, these results provide valuable insight on the importance of fitness costs associated with fungicide resistance. This study confirmed that fungicide resistance might not entail a fitness cost, at least for the parameter tested in this study. Indeed, resistance to multiple classes of fungicides does not affect capacity to cause lesions (CCL) in *B. squamosa* under optimal environmental conditions. The results might have been different under field conditions or if different fitness parameters

were tested. Nevertheless, these results have implications for resistance management strategies, as the levels of resistance described here might be more alarming for onion producers than previously thought. As the search for fitness costs associated with fungicide resistance in *B. squamosa* continues, prevention of fungicide resistance accumulation becomes increasingly important to maintain fungicide efficacy against onion leaf blight. Coordinated monitoring efforts must be made on a regional and national level to allow the adoption of practices that mitigate and prevent fungicide development (R4P network 2021). Eventually, practices such as using resistance thresholds to modify fungicide programs might be a practical way to help farmers manage fungicide resistance.

## 2.6 References

- Ajouz, S., P. C. Nicot, and M. Bardin. 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Path* 59:556–566.
- Allen, R. C., J. Engelstädter, S. Bonhoeffer, B. A. McDonald, and A. R. Hall. 2017. Reversing resistance: different routes and common themes across pathogens. *Proc. R. Soc. B.* 284:20171619.
- Amiri, A., S. M. Heath, and N. A. Peres. 2013. Phenotypic Characterization of Multifungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in Florida. *Plant Disease* 97:393–401.
- Amiri, A., A. I. Zuniga, and N. A. Peres. 2020. Mutations in the Membrane-Anchored SdhC Subunit Affect Fitness and sensitivity to Succinate Dehydrogenase Inhibitors in *Botrytis cinerea* Populations from Multiple Hosts. *Phytopathology* 110:327–335.
- Billard, A., S. Fillinger, P. Leroux, H. Lachaise, R. Beffa, and D. Debieu. 2011. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science* 68:684–691.
- Brent, K. J., and D. Hollomon. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? *Fungicide Resistance Action Committee*.
- Carisse, O., H. A. McCartney, J. A. Gagnon, and L. Brodeur. 2005. Quantification of Airborne Inoculum as an Aid in the Management of Leaf Blight of Onion Caused by *Botrytis squamosa*. *Plant Disease* 89:726–733.
- Carisse, O., N. McRoberts, and L. Brodeur. 2008. Comparison of monitoring- and weather-based risk indicators of botrytis leaf blight of onion and determination of action thresholds. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30:442–456.
- Carisse, O., D. Rolland, and D.-M. Tremblay. 2006. Effect of *Microsphaeropsis ochracea* on Production of Sclerotia-borne and Airborne Conidia of *Botrytis squamosa*. *Biocontrol* 51:107–126.
- Carisse, O., and D. M. Tremblay. 2007. Incidence and Significance of Iprodione-Insensitive Isolates of *Botrytis squamosa*. *Plant Disease* 91:41–46.
- Carisse, O., D. M. Tremblay, C. A. Lévesque, K. Gindro, P. Ward, and A. Houde. 2009. Development of a TaqMan Real-Time PCR Assay for Quantification of Airborne Conidia of *Botrytis squamosa* and Management of Botrytis Leaf Blight of Onion. *Phytopathology* 99:1273–1280.
- Carisse, O., D.-M. Tremblay, M. R. McDonald, L. Brodeur, and N. McRoberts. 2011. Management of Botrytis Leaf Blight of Onion: The Québec Experience of 20 Years of Continual Improvement. *Plant Disease* 95:504–514.

- Chen, S. N., C. X. Luo, M. J. Hu, and G. Schnabel. 2016. Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Isolates with Resistance to Multiple Chemical Classes of Fungicides. *Phytopathology* 106:997–1005.
- Cosseboom, S., and M. Hu. 2021. Identification and Characterization of Fungicide Resistance in *Botrytis* Populations from Small Fruit Fields in the Mid-Atlantic United States. *Plant Disease* 105:2366–2373.
- Delmas, C. E. L., Y. Dussert, L. Delière, C. Couture, I. D. Mazet, S. R. Cervera, and F. Delmotte. 2017. Soft selective sweeps in fungicide resistance evolution: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. *Molecular Ecology* 26:1936–1951.
- Elderfield, J. A. D., F. J. Lopez-Ruiz, F. van den Bosch, and N. J. Cunniffe. 2018. Using Epidemiological Principles to Explain Fungicide Resistance Management Tactics: Why do Mixtures Outperform Alternations? *Phytopathology* 108:803–817.
- Ellerbrock, L. A., and J. W. Lorbeer. 1977. Source of Primary inoculum of *Botrytis squamosa*. *Phytopathology* 67:363–372.
- Fernández-Ortuño, D., F. Chen, and G. Schnabel. 2012. Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in the Carolinas. *Plant Disease* 96:1198–1203.
- Gossen, B. D., O. Carisse, L. M. Kawchuk, H. V. D. Heyden, and M. R. McDonald. 2014. Recent changes in fungicide use and the fungicide insensitivity of plant pathogens in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 36:327–340.
- Hagerty, C. H., R. C. Graebner, K. E. Sackett, and C. C. Mundt. 2017. Variable competitive effects of fungicide resistance in field experiments with a plant pathogenic fungus. *Ecological Applications* 27:1305–1316.
- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7:133–141.
- Hancock, J. G., and J. W. Lorbeer. 1963. Pathogenesis of *Botrytis cinerea*, *B. squamosa*, and *B. alli* on onion leaves. *Phytopathology* 53:669–673.
- Hawkins, N. J., and B. A. Fraaije. 2018. Fitness Penalties in the Evolution of Fungicide Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 56:339–360.
- Hay, F. S., S. Sharma, C. Hoepfing, D. Strickland, K. Luong, and S. J. Pethybridge. 2019. Emergence of *Stemphylium* Leaf Blight of Onion in New York Associated With Fungicide Resistance. *Plant Disease* 103:3083–3092.
- Hobbelen, P. H. F., N. D. Paveley, and F. van den Bosch. 2011. Delaying Selection for Fungicide Insensitivity by Mixing Fungicides at a Low and High Risk of Resistance Development: A Modeling Analysis. *Phytopathology* 101:1224–1233.

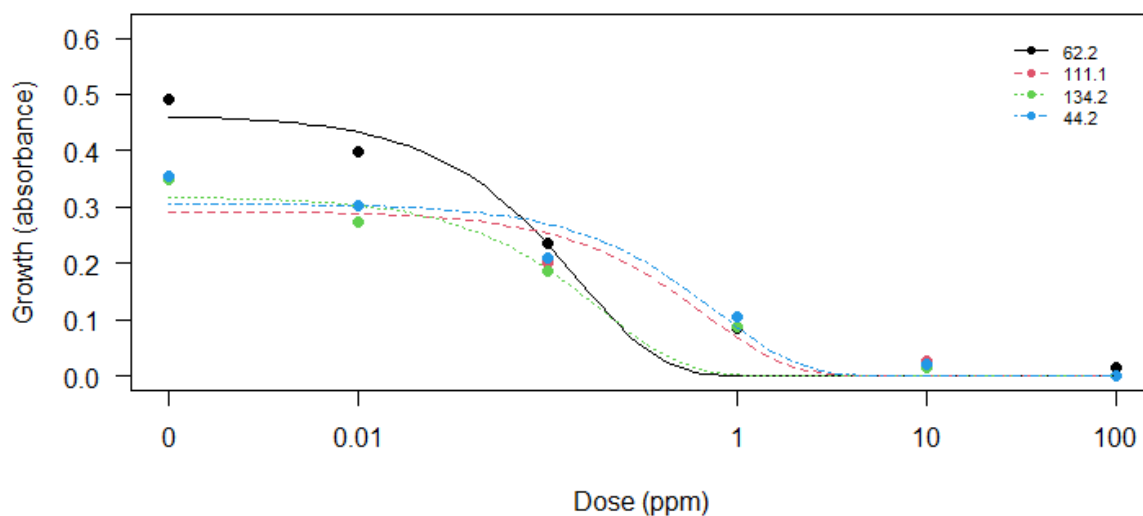


- Hsiang, T., L. Yang, and W. Barton. 1998. Relative virulence of isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* with varying sensitivity to propiconazole. *European Journal of Plant Pathology* 104:163–169.
- Hulvey, J., J. T. Popko, H. Sang, A. Berg, and G. Jung. 2012. Overexpression of *ShCYP51B* and *ShatrD* in *Sclerotinia homoeocarpa* Isolates Exhibiting Practical Field Resistance to a Demethylation Inhibitor Fungicide. *Applied and Environmental Microbiology* 78:6674–6682.
- Kozhar, O., M. M. Larsen, N. J. Grünwald, and T. L. Peever. 2020. Fungal Evolution in Anthropogenic Environments: *Botrytis cinerea* Populations Infecting Small Fruit Hosts in the Pacific Northwest Rapidly Adapt to Human-Induced Selection Pressures. *Applied Environmental Microbiology* 86.
- Kretschmer, M., M. Leroch, A. Mosbach, A.-S. Walker, S. Fillinger, D. Mernke, H.-J. Schoonbeek, J.-M. Pradier, P. Leroux, M. A. D. Waard, and M. Hahn. 2009. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens* 5:e1000696.
- Labrie, G., A.-È. Gagnon, A. Vanasse, A. Latraverse, and G. Tremblay. 2020. Impacts of neonicotinoid seed treatments on soil-dwelling pest populations and agronomic parameters in corn and soybean in Quebec (Canada). *PLOS ONE* 15:e0229136.
- Lalève, A., S. Fillinger, and A.-S. Walker. 2014. Fitness measurement reveals contrasting costs in homologous recombinant mutants of *Botrytis cinerea* resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. *Fungal Genetics and Biology* 67:24–36.
- Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A.-S. Walker. 2010. Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold. *Applied Environmental Microbiology* 76:6615–6630.
- Lévesque, A., C. Kermagoret, T. G. Poder, C. L'Ecuyer-Sauvageau, J. He, S. Sauvé, and J. Dupras. 2021. Financing on-farm ecosystem services in southern Quebec, Canada: A public call for pesticides reduction. *Ecological Economics* 184:106997.
- Mair, W., F. Lopez-Ruiz, G. Stammler, W. Clark, F. Burnett, D. Hollomon, H. Ishii, T. S. Thind, J. K. Brown, B. Fraaije, H. Cools, M. Shaw, S. Fillinger, A.-S. Walker, E. Mellado, G. Schnabel, A. Mehl, and R. P. Oliver. 2016. Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. *Pest Management Science* 72:1449–1459.
- Mernke, D., S. Dahm, A.-S. Walker, A. Lalève, S. Fillinger, M. Leroch, and M. Hahn. 2011. Two Promoter Rearrangements in a Drug Efflux Transporter Gene Are Responsible for the Appearance and Spread of Multidrug Resistance Phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* Isolates in French and German Vineyards. *Phytopathology* 101:1176–1183.
- Mikaberidze, A., and B. A. McDonald. 2015. Fitness Cost of Resistance: Impact on Management. Pp. 77–89 in H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Springer Japan, Tokyo.

- Mikaberidze, A., B. A. McDonald, and S. Bonhoeffer. 2013. Can High-Risk Fungicides be Used in Mixtures Without Selecting for Fungicide Resistance? *Phytopathology* 104:324–331.
- Molaei, H., M. Abrinbana, and Y. Ghosta. 2020. Baseline sensitivities to azoxystrobin and tebuconazole in *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from sunflower in Iran related to sensitivities to carbendazim and iprodione. *Journal of Phytopathology* 168:353–362.
- Network, R. 2021. Monitoring systems for resistance to plant protection products across the world: Between redundancy and complementarity. *Pest Management Science* 77:2697–2709.
- Nielsen, B. J., N. L. Jensen, P. Hartvig, H. Louise, and R. W. Weber. 2021. Fungicide Resistance in *Botrytis* in Danish Strawberry Production. *Erwerbs - Obstbau* 63:1–6.
- Noel, Z. A., J. Wang, and M. I. Chilvers. 2018. Significant Influence of EC50 Estimation by Model Choice and EC50 Type. *Plant Disease* 102:708–714.
- PMRA. 2022. Proposed Special Review Decision PSRD2022-01 Special review of chlorothalonil and its associated end-use products. Accessed 9<sup>th</sup> July 2022. Available at: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/consumer-product-safety/pesticides-pest-management/public/consultations/proposed-special-review-decision/2022/chlorothalonil/document.html#a4.1.4>
- Raposo, R., V. Gomez, T. Urrutia, and P. Melgarejo. 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* Associated with Dicarboximide Resistance. *Phytopathology* 90:1246–1249.
- Ritz, C., F. Baty, J. C. Streibig, and D. Gerhard. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One* 10:e0146021.
- Runkle, J., J. Flocks, J. Economos, and A. L. Dunlop. 2017. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environment International* 99:29–42.
- Rupp, S., R. W. S. Weber, D. Rieger, P. Detzel, and M. Hahn. 2017. Spread of *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture. *Frontiers in Microbiology* 7:2075.
- Russell, P. E. 2005. A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science* 143:11–25.
- Scalliet, G., J. Bowler, T. Luksch, L. Kirchhofer-Allan, D. Steinhauer, K. Ward, M. Niklaus, A. Verras, M. Csukai, A. Daina, and R. Fonné-Pfister. 2012. Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 7:e35429.
- Stammler, G., and J. Speakman. 2006. Microtiter Method to Test the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *Journal of Phytopathology* 154:508–510.
- Steentjes, M. B. F., O. E. Scholten, and J. A. L. van Kan. 2021. Peeling the Onion: Towards a Better Understanding of *Botrytis* Diseases of Onion. *Phytopathology* 111:464–473.

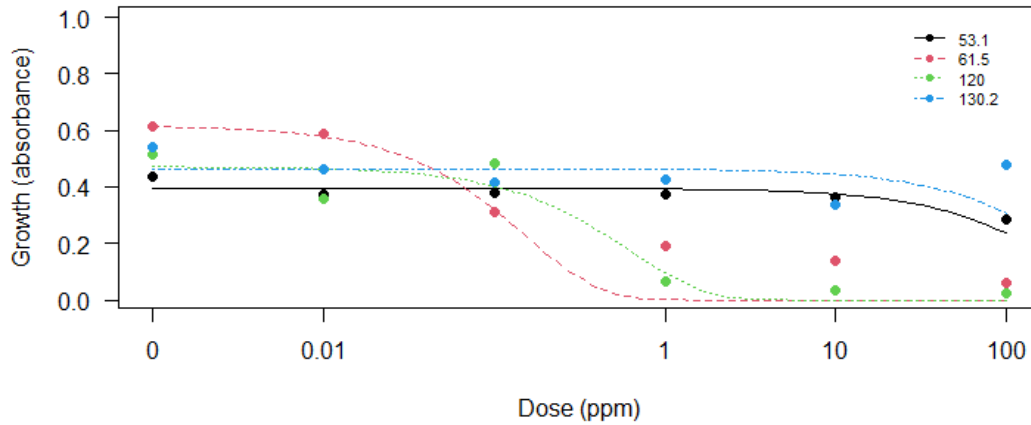
- Tremblay, D. M., B. G. Talbot, and O. Carisse. 2003. Sensitivity of *Botrytis squamosa* to different classes of fungicides. *Plant Disease* 87:573–578.
- Van der Heyden, H., G. J. Bilodeau, O. Carisse, and J.-B. Charron. 2020. Monitoring of *Peronospora destructor* Primary and Secondary Inoculum by Real-Time qPCR. *Plant Disease* 104:3183–3191.
- Van der Heyden, H., P. Dutilleul, L. Brodeur, and O. Carisse. 2014. Spatial Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms Related to Fungicide Resistance and Implications for Sampling. *Phytopathology* 104:604–613.
- Veloukas, T., P. Kalogeropoulou, A. N. Markoglou, and G. S. Karaoglanidis. 2014. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. *Phytopathology* 104:347–356.
- Walker, A.-S., A. Micoud, F. Rémuson, J. Grosman, M. Gredt, and P. Leroux. 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science* 69:667–678.
- Walker, A.-S., V. Ravigne, A. Rieux, S. Ali, F. Carpentier, and E. Fournier. 2017. Fungal adaptation to contemporary fungicide applications: the case of *Botrytis cinerea* populations from Champagne vineyards (France). *Molecular Ecology* 26:1919–1935.
- Walker, J. C. 1925. Two undescribed species of *Botrytis* associated with the neck rot disease of onion bulbs. *Phytopathology* 15:708–713.
- Weber, R. W. S., and M. Hahn. 2019. Grey mould disease of strawberry in northern Germany: causal agents, fungicide resistance and management strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:1589–1597.
- Weber, R. W. S., and M. Hahn. 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Journal of Plant Disease Protection* 118:17–25.
- Zuniga, A. I., M. S. Oliveira, C. S. Rebello, and N. A. Peres. 2020. Baseline Sensitivity of *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry to Isofetamid Compared to other SDHIs. *Plant Disease* 104:1224–1230.

## 2.7 Supplementary information



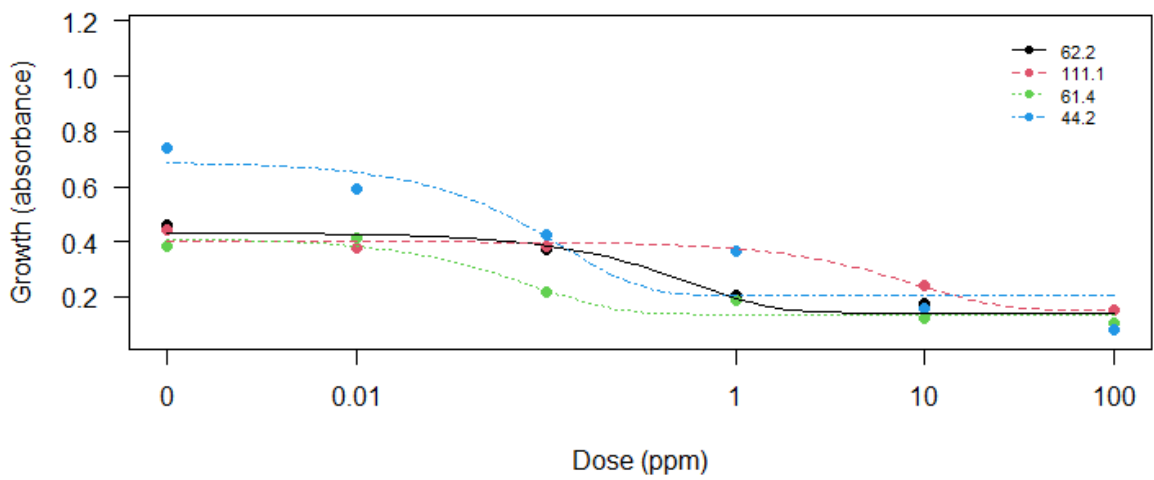
**Figure S1: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to pyraclostrobin dose**

The 4 isolates subset illustrates the bi-modal distribution of resistance to pyraclostrobin over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate  $EC_{50}$  values.



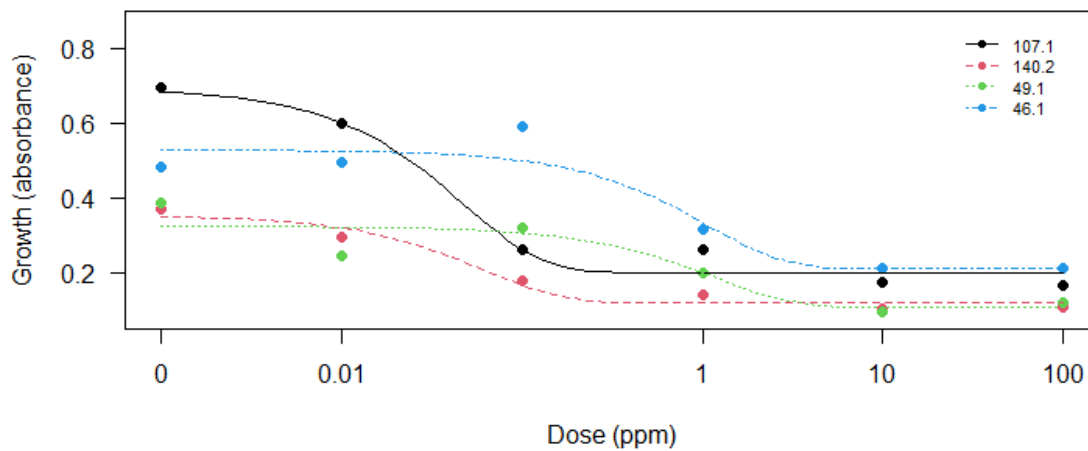
**Figure S2: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to boscalid dose**

The 4 isolates subset illustrates the bi-modal distribution of resistance to boscalid over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate  $EC_{50}$  values.



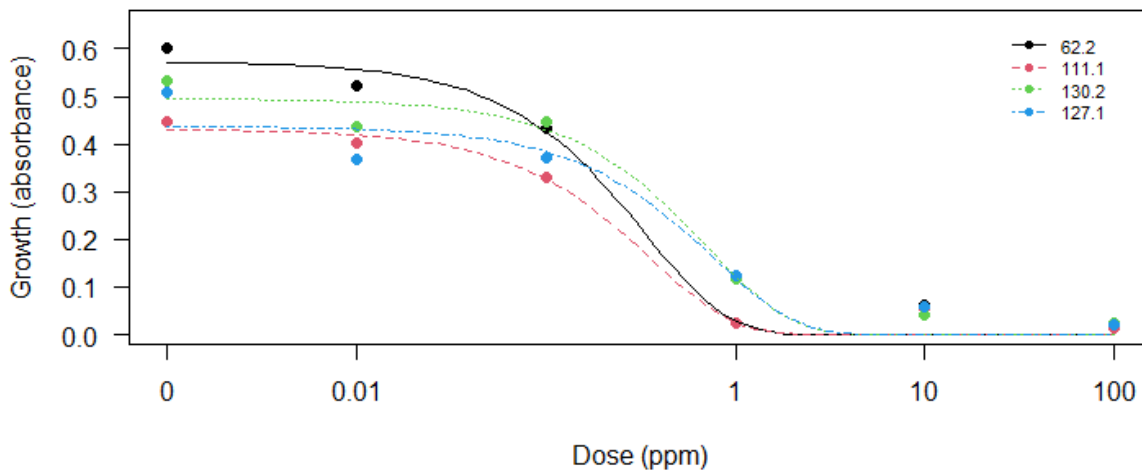
**Figure S3: Adjusted growth curves a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to picoxystrobin dose**

The 4 isolates subset illustrates the bi-modal distribution of resistance to picoxystrobin over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate EC<sub>50</sub> values.



**Figure S4: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to fluxapyroxad dose**

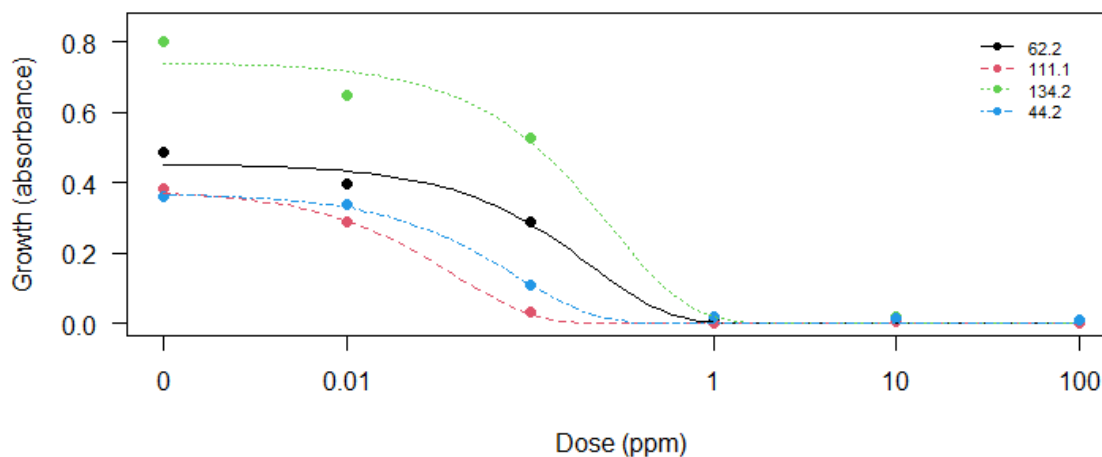
The 4 isolates subset illustrates the bi-modal distribution of resistance to fluxapyroxad over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate  $EC_{50}$  values.



**Figure S5: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to pyrimethanil dose**

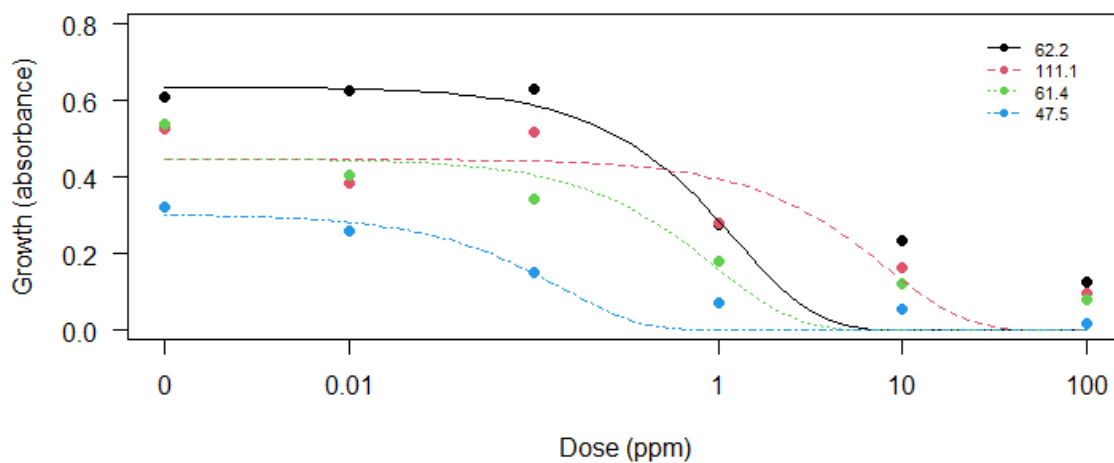
The 4 isolates subset illustrates the bi-modal distribution of resistance to pyrimethanil over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate  $EC_{50}$  values.





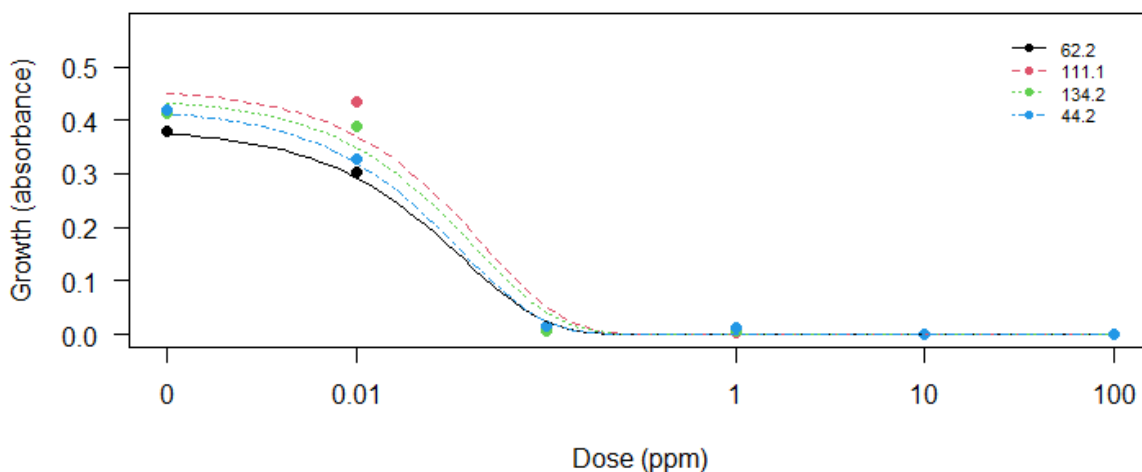
**Figure S6: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to difenoconazole dose**

The 4 isolates subset illustrates the continuous distribution of resistance to difenoconazole over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate EC<sub>50</sub> values.



**Figure S7: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to fluopyram dose**

The 4 isolates subset illustrates the multi-modal distribution of resistance to fluopyram over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate  $EC_{50}$  values.



**Figure S8: Adjusted growth curves on a subset of 4 *B. squamosa* isolates according to fludioxonil dose**

The 4 isolates subset illustrates the continuous distribution of resistance to fludioxonil over the 87 *B. squamosa* isolates tested. Growth was measured as absorbance using a spectrophotometer at 6 doses of active ingredient (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm) in liquid media. Exponential decay functions were then fitted on data to estimate EC<sub>50</sub> values.

**Table S1: Analysis of variance for capacity to cause lesion on onion leaves of 59 *B. squamosa* isolates**

	Df	Sum sq	Mean sq	F value	Pr (>F)
Isolate	57	5891	103.35	19.066	<0.0001
Growth Chamber	1	19	18.98	3.501	0.0618
Residuals	700	3795	5.42		

CCL for each isolate was repeated twice, with 5 replicates per experimental run per isolate. A negative and positive control was used in every experimental run.



## CHAPITRE 3

### CO-INFECTIONS PAR DEUX ESPÈCES DE BOTRYTIS : IMPLICATIONS POUR LA MALADIE DE LA BRÛLURE DE LA FEUILLE DE L'OIGNON

#### 3.1 Introduction

Dans la nature ou en contexte agricole, les plantes sont confrontées à une multitude de microorganismes, pathogènes ou non, qui interagissent dans le phytobiome (Fitt et al., 2006; Malpica et al., 2006; Abdullah et al., 2017). En phytopathologie, l'étude de ces interactions est complexe et historiquement freinée par les défis méthodologiques, notamment l'identification d'agents pathogènes proches basée sur la symptomatologie, particulièrement en ce qui concerne les co-infections (Tollenaere et al., 2016). Les avancées en matière de diagnostic moléculaire permettent maintenant de quantifier les populations des différents agents pathogènes et d'identifier avec précision les responsables des dommages observés (Radhakrishnan et al., 2019). Les études récentes en la matière démontrent que les co-infections sont plus fréquentes que précédemment répertoriées (López-Villavicencio et al., 2011) et peuvent mener au développement de symptômes plus sévères dans certains pathosystèmes. Par exemple, la sévérité des symptômes associés au pied noir de la vigne, normalement causée par des espèces du genre *Ilyonectria* a été aggravée par la co-inoculation des vignes avec des espèces appartenant à la famille des Botryosphaeriaceae (Whitelaw-Weckert et al., 2013). La présence de co-infections soulève plusieurs questions importantes, notamment sur l'étiologie et l'épidémiologie des différentes espèces impliquées (Susi et al., 2015). Comme le soulignent Tollenaere et al., (2016), il existe un manque de données empiriques permettant de comparer les dommages causés par une infection simple avec une co-infection pour un pathosystème donné. Ce type d'information est crucial pour élaborer des modèles épidémiologiques réalistes, desquels découlent des stratégies de gestion adaptées.

*Botrytis squamosa* est largement documenté comme étant l'agent causal de la brûlure de la feuille de l'oignon (Carisse et al., 2011; Hickman and Ashworth 1943). Ce champignon

phytopathogène infecte les feuilles d'oignons grâce à des spores issus de la reproduction asexuée (conidies) et dans une moindre mesure sexuée (ascospores) (Ellerbrock et Lorbeer 1977). Les spores germent à la surface des feuilles puis les pénètrent soit en entrant directement par les stomates, soit en formant un appressorium à l'extrémité du tube germinatif, ce qui lui permet d'entrer dans la plante entre les parois anticlinales de deux cellules. Par la suite, *B. squamosa* croît de façon végétative à l'intérieur de la plante pour coloniser les cellules avoisinantes et se nourrir (Steenjtes et al., 2021a). Cela cause l'affaissement de l'épiderme et laisse un symptôme s'apparentant à un point blanc entouré d'un halo à la surface des feuilles (Lacy et Lorbeer 2008).

Par ailleurs, on sait que d'autres espèces, comme *B. cinerea*, peuvent également causer des symptômes foliaires similaires à ceux causés par *B. squamosa*. Dans les années 1960 et 1970, la pathogénicité de *B. cinerea* sur des feuilles d'oignons a été brièvement explorée, principalement les conditions sous lesquelles les conidies de *B. cinerea* pouvaient germer sur des feuilles d'oignons (Clark et Lorbeer 1976). Cependant, les taches foliaires superficielles causées par *B. cinerea* ne se développent jamais dans les espaces intracellulaires de la feuille et ne provoquent pas de dépérissement. Pour cette raison, *B. cinerea* n'est généralement pas considéré comme un agent causal de la brûlure de la feuille de l'oignon.

Plus récemment, des résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet « Biovigilance » d'Agriculture et agroalimentaire Canada (Carisse O. 2021, communication personnelle) confirment la présence simultanée d'inoculum de *B. cinerea* et de *B. squamosa* dans l'air dans des champs d'oignons (Tableau 3.1). Cependant, l'effet (antagonisme ou synergisme) de la co-infection de *B. cinerea* et *B. squamosa* dans les champs d'oignons n'est pas documenté. Le tableau 3.1 compile les données de capteurs de spores au cours de la saison 2021.

**Tableau 3.1: Présence aérienne de conidies appartenant aux espèces *B. squamosa* et *B. cinerea* dans trois champs d'oignons en Montérégie**

Date	Site	Nombre de spores/m <sup>3</sup> <i>B. cinerea</i> <sup>a</sup>	Nombre de spores/m <sup>3</sup> <i>B. squamosa</i> <sup>b</sup>
6/20/2021	SSQC13	2	0
6/20/2021	SSQC14	1	0
6/27/2021	SSQC12	16	0
6/27/2021	SSQC13	15	0
6/27/2021	SSQC14	4	0
7/4/2021	SSQC12	18	0
7/4/2021	SSQC13	4	0
7/4/2021	SSQC14	1	0
7/11/2021	SSQC12	39	0
7/11/2021	SSQC13	3	0
7/11/2021	SSQC14	1	0
7/18/2021	SSQC13	34	0
7/18/2021	SSQC14	6	0
7/25/2021	SSQC12	2	0
7/25/2021	SSQC13	14	0
7/25/2021	SSQC14	0	0
8/1/2021	SSQC12	71	24
8/1/2021	SSQC13	5	0
8/1/2021	SSQC14	27	0
8/8/2021	SSQC13	12	350
8/8/2021	SSQC14	111	0
8/15/2021	SSQC13	15	89
8/15/2021	SSQC14	44	0

Présence de conidies appartenant aux espèces *B. squamosa* et *B. cinerea* dans des échantillons d'air de trois champs d'oignons en Montérégie lors de la saison de croissance 2021 mesurée par qPCR.

<sup>a</sup> Carisse, O. et al., 2014. <sup>b</sup> Carisse, O., et al., 2009

La présence de conidies de *B. cinerea* dans l'air en soi n'est pas étonnante vu l'ubiquité du pathogène et son grand répertoire d'hôtes potentiels. Cependant, ces observations de coexistances couplées au fait que plus de la moitié des *Botrytis spp.* isolées à partir de lésions sporulantes sur des feuilles d'oignons dans le cadre des expériences réalisées au Chapitre 2 n'appartenaient pas à l'espèce *B. squamosa* soulèvent des questions quant à l'implication potentielle de *B. cinerea* dans la maladie de la brûlure de la feuille. Ces observations corroborent une étude menée par Misawa et Takeuchi (2015) selon laquelle des conidies appartenant aux deux espèces peuvent être isolées à partir de feuilles symptomatiques de ciboulette chinoise (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel) à différent moment de la saison. Qui plus est, les résultats d'essais visant à évaluer l'agressivité des souches de *B. squamosa* et de *B. cinerea* précédemment isolées ont démontré que les deux espèces peuvent causer des lésions s'apparentant à la brûlure des feuilles de l'oignon (Misawa et Takeuchi 2015). En 1986, Ramsey et Lorbeer ont aussi observé que plusieurs espèces de *Botrytis*, incluant *B. cinerea*, *B. squamosa* et *B. allii* pouvaient causer des symptômes de brûlures sur les hampes florales d'oignons (Ramsey et Lorbeer 1986).

La biologie et pathogénicité de plusieurs espèces de *Botrytis* sur des espèces de la famille des *Allium* sont bien répertoriées (Lorbeer et al 2007, Carisse et al., 2012). La nature saprophyte de *B. cinerea*, son inhabileté à causer des symptômes de brûlures des pointes suite à son inoculation seule sur des feuilles d'oignons et son ubiquité l'avaient jusqu'ici exclu du statut d'agent causal de la brûlure de la feuille de l'oignon (Hancock and Lorbeer 1963, Steentjes et al., 2021b). Cependant, bien que la coexistence potentielle de *B. squamosa* et *B. cinerea* sur les feuilles d'oignons soulève des questions quant aux interactions entre ces deux espèces, elle est très peu répertoriée dans la littérature (Misawa et Takeuchi 2015). Une compétition entre les deux espèces pour une même niche écologique pourrait avoir un impact sur la reproduction et la dispersion des agents pathogènes impliqués (Fitt et al., 2006; Muafo-Tchinda et al., 2022). De plus, le potentiel effet synergique entre les deux espèces n'a jamais été étudié. Globalement, il existe encore plusieurs zones d'ombre quant à la pathogénicité de *B. cinerea* sur des feuilles d'oignons. Par exemple, serait-il possible que *B. cinerea* profite des lésions causées par *B. squamosa* pour infecter les feuilles d'oignons? En d'autres mots, l'inoculum de *B. cinerea* a-t-



il un effet sur les symptômes de brûlure de la feuille s'il est présent après une infection causée par *B. squamosa*? Qu'en est-il de sa présence dans l'air en même temps que des spores de *B. squamosa*? Une réponse positive à certaines questions de recherche posées ici pourrait avoir un impact important sur la gestion de la maladie de la brûlure de la feuille. En effet, s'il s'avère que *B. cinerea* cause ou amplifie des dommages normalement associés à *B. squamosa*, certains seuils d'interventions devront être adaptés en plus de pondérer l'importance de certains pathogènes dans les systèmes de surveillance aérobiologiques.

Pour répondre à ces questions, l'hypothèse de travail suivante a été émise : « une infection des oignons par *B. cinerea* pourrait augmenter l'intensité des dommages préalablement causés par une infection par *B. squamosa* ». Les objectifs de cette étude étaient : (1) isoler des souches de *B. cinerea* à partir de feuilles symptomatiques d'oignons et (2) mesurer les dommages causés sur des plants d'oignons par des infections avec *B. cinerea* pendant et après des infections à *B. squamosa* grâce à des essais *in vivo* en conditions contrôlées. Ce projet s'inscrit comme une première étape dans l'étude des co-infections dans la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon.

## **3.2 Matériels et méthodes**

### *3.2.1 Provenance des isolats*

Les isolats utilisés dans les expériences de co-inoculations du présent chapitre proviennent tous de la collection 2020 telle que décrite dans le chapitre 2 (section 2.3.1). Brièvement, à la fin de l'été 2020, 13 champs de la région des jardins de Napierreville en Montérégie-Ouest, Qc, Canada ont été sélectionnés. Dans chacun de ces champs, 10 échantillons par champs de feuilles d'oignons présentant des symptômes associés à la brûlure des feuilles de l'oignon ont été prélevés. Les feuilles d'oignons ont été placées en conditions qui favorisent la sporulation et des conidies sporulant à partir d'une lésion ont été récupérées sur un écouvillon stérile (un écouvillon par lésions). Par la suite, les écouvillons ont été ensemencés sur du PDA amendé d'antibiotiques (39g/L de PDA en plus de 01g/L de novobiocine) et des mono-colonies

s'apparentant visuellement au genre *Botrytis* ont été repiquées sur des pétris de PDA. Pour la conservation à long terme, chaque isolat a été repiqué et inoculé dans un tube de terre noire stérile (Promix, PremierTech) avant d'être placé à 4°C.

### 3.2.2 Identité des isolats de la Collection 2020

Afin de déterminer les isolats appartenant à l'espèce *B. squamosa* ou *B. cinerea* dans la collection, des tests de qPCR spécifiques à chacune des espèces ont été réalisés. Les isolats de la collection ont en premier lieu tous été testés pour leur appartenance à l'espèce *B. squamosa* tel que décrit au chapitre 2 (section 2.3.2). Les isolats n'ayant pas été associés à l'espèce *B. squamosa* ont été testés à l'aide d'un test qPCR spécifique à *B. cinerea* tel que décrit dans Carisse et al. (2014).

### 3.2.3 Mélanges d'isolats

Deux mélanges d'inoculum principaux ont été préparés pour composer huit traitements. Le premier mélange était composé à parts égales de conidies provenant de 4 isolats *B. squamosa* et le second, composé à parts égales de conidies provenant de 4 isolats de *B. cinerea*. Le choix des isolats utilisés dans le mélange était basé sur le critère d'agressivité: les isolats devaient être associés à une agressivité dite "moyenne". Comme l'expérience de co-inoculation avait pour but de déterminer si la présence des deux espèces (co-inoculation) causera une sévérité de symptômes plus accrue que celle observée à la suite des inoculations avec une seule espèce, il était important de ne pas introduire de biais et donc d'utiliser des souches ayant des agressivités similaires. Les isolats très agressifs ou très peu agressifs ont donc été exclus (Weeds et al., 2000). En choisissant quatre isolats d'agressivité moyenne dans les mélanges, on assurait une certaine diversité génétique tout en restant dans une fourchette représentative quant à l'agressivité.

Le choix des isolats de *B. squamosa* ont été faits en fonction des résultats de capacité à causer des lésions précédemment obtenues dans le chapitre 2 (section 2.3.5) et tels que décrits à la figure 3.2. Ainsi, les isolats "125.2", "75.1", "134.2" et "136.2" ont été choisis aléatoirement

parmi les isolats ayant une agressivité moyenne dans la collection “2020”. Les catégories d’agressivité avaient été obtenues grâce à des analyses de classifications hiérarchiques.

Comme l’agressivité des isolats appartenant à l’espèce *B. cinerea* n’avait pas été préalablement testée, des tests de croissance radiale *in vivo* ont été effectués sur 15 isolats afin de comparer et répertorier ceux ayant une agressivité moyenne en fonction de l’agressivité de tous les isolats testés. Les tests de croissance radiale sont une version adaptée sur les feuilles d’oignon du protocole décrit dans Lalève et al. (2014). Pour se faire, 15 isolats appartenant à l’espèce *B. cinerea*, qui avait été isolés à partir de champs d’oignons exclusivement, ont été sélectionnés aléatoirement dans la collection 2020 et remis en culture à partir des tubes de sols entreposés dans la mycothèque tel que décrit dans au chapitre 2 (section 2.3.1). Après 72h d’incubation à température pièce (20-24°C), chaque isolat a été repiqué sur un pétri contenant une gélose d’extrait de pomme de terre (PDA) (39 g/L d’extrait de pomme de terre, de dextrose et d’agar). Par la suite, 2 ml d’eau stérile ont été ajoutés à deux papiers filtres stériles au fond d’un plat de pétri de 9 cm de diamètre. Des feuilles d’oignons verts (*Alium fistulosum*) ont été coupées en tronçon de 2 cm de longueur et ouvertes sur le sens de la longueur de façon à créer des rectangles d’environ 4 cm<sup>2</sup>. Les feuilles ont ensuite été stérilisés en surface (trempage d’une minute dans une solution 1% d’hypochlorite de sodium puis deux bains successifs d’une minute dans de l’eau distillée autoclavée), puis épongées sur un papier absorbant stérile avant d’être déposées, face extérieure de la feuille vers le haut, dans le plat de Pétri contenant les papiers filtres humides. À l’aide d’un emporte-pièce de 5 mm, un explant mycélien provenant de l’isolat à tester a ensuite été déposé au centre de la feuille, mycélium vers le bas. Le plat de pétri a été scellé avec du parafilm et incubé à température ambiante durant 72h. Finalement, le diamètre des dommages causés sur la feuille a été mesuré en deux axes perpendiculaires (voir figure 3.1). Le diamètre de l’explant n’a pas été inclus dans le calcul. La moyenne des axes a été retenue comme mesure d’agressivité de l’isolat et utilisée pour les analyses ultérieures. En excluant l’isolat le plus agressif et le moins agressif, les 4 isolats suivants ont été sélectionnés aléatoirement: “54.1”, “80.1”, “67.1” et “72.1” pour constituer le mélange d’inoculum « *B. cinerea* ».



**Figure 3.1: Exemple de test d'agressivité in vivo d'isolats de *B. cinerea* sur des feuilles d'oignons verts**

Explant mycélien appartenant à l'espèce *B. cinerea* de 5 mm sur PDA colonise un tronçon de feuille d'oignon vert après 72h d'incubation à température pièce. L'agressivité a été mesurée comme la moyenne en deux axes de la lésion (excluant le diamètre de l'explant).

### 3.2.4 Production de conidies

Afin de réaliser les essais de co-inoculations sur des plants d'oignons, il a fallu une quantité importante de conidies provenant des isolats préalablement choisis. Pour les quatre isolats de l'espèce *B. squamosa*, des conidies congelées ont été utilisées pour les inoculations. Afin de vérifier la viabilité des conidies, des tests de germination ont été effectués pour les quatre isolats. Ces tests consistaient à disperser 100µL de la solution de conidies sur un pétri d'eau gélosée (15g/L), puis comparer le nombre de conidies germées (sur 100 conidies) initialement puis après 24h d'incubation à température ambiante à l'aide d'un microscope optique inversé. Avec un taux de germination supérieur à 85%, les solutions de conidies ont été considérées viables et utilisées pour constituer le mélange d'inoculum « *B. squamosa* ».

Afin de produire des conidies à partir des isolats de *B. cinerea* sélectionnés, les isolats ont été remis en culture à partir des tubes de sols sur un pétri de PDA conformément à la procédure décrite au chapitre 2 (section 2.3.1). Les pétris ont par la suite été scellés avec du parafilm et incubés à température ambiante jusqu'à ce qu'une sporulation, caractérisée par un duvet grisâtre au-dessus du mycélium, soit observée. Pour récupérer les conidies, 10 ml de solution de glycérol à 5% a été ajoutée sur les pétris sporulant à l'aide d'une micropipette et doucement dispersée sur le pétri à l'aide d'un étaleur stérile afin de décrocher les conidies des conidiophores sans abîmer le mycélium. Par la suite, la solution de glycérol contenant les conidies a été récupérée du dessus du pétri à l'aide d'une micropipette (1 ml) puis déposée dans un tube conique de 15 ml (Falcon, Fisher Scientific).

### 3.2.5 Dispositif expérimental

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle une infection des oignons par *B. cinerea* pourrait augmenter l'intensité des dommages préalablement causés par une infection par *B. squamosa*, huit différents traitements ont été testés. Ces traitements ont été choisis dans le but d'isoler l'effet d'une infection initiale par *B. cinerea* et l'effet temporel d'une seconde infection, qu'elle soit due à *B. squamosa* ou *B. cinerea*. Chacun des huit traitements comportaient 10 répliques

(plants d'oignons), séparés dans deux chambres de croissance distinctes et dispersés de façon aléatoire à l'intérieur des chambres de croissance. L'expérience a été répétée deux fois.

Les huit traitements testés dans ce dispositif expérimental sont basés sur l'utilisation de deux mélanges d'inoculum principaux: un mélange d'inoculum constitué d'isolats de *B. squamosa* concentré à  $7.5 \times 10^4$  conidies/ml et un mélange d'inoculum constitué d'isolats de *B. cinerea* concentré à  $7.5 \times 10^4$  conidies/ml. Pour obtenir ces mélanges d'inoculum initiaux, les solutions de conidies de chacun des quatre isolats utilisés dans le mélange d'inoculum « *B. squamosa* » et les solutions de conidies de chacun des quatre isolats utilisés dans le mélange d'inoculum « *B. cinerea* » ont individuellement été ajustées à une concentration de  $7.5 \times 10^4$  conidies/ml puis congelés à  $-20^\circ\text{C}$  pour leur conservation.

Au jour 1 de l'expérience, 44 ml d'inoculum « *B. squamosa* » composé à parts égales de solutions des quatre isolats préalablement sélectionnés appartenant à l'espèce *B. squamosa* ("125.2", "75.1", "134.2" et "136.2") a été assemblé dans un tube conique de 50 ml. Suivant la même procédure, 28 ml d'inoculum « *B. cinerea* » composé à parts égales de solutions des quatre isolats préalablement sélectionnés appartenant à l'espèce *B. cinerea* ("54.1", "80.1", "67.1" et "72.1") a été assemblé dans un tube conique de 50 ml. À partir de ces deux solutions d'inoculum initiales, chacun des huit traitements décrits dans le Tableau 3.2 a été préparé et aliquoté en portions de 0.75 ml chacun.

**Tableau 3.2 : Composition de l'inoculum des huit traitements de co-infection de plants d'oignons par *B. squamosa* et *B. cinerea***

Traitement	Quantité d'inoculum « <i>B. squamosa</i> » (ml) [7.5x10 <sup>4</sup> conidies/ml]	Quantité d'inoculum « <i>B. cinerea</i> » (ml) [7.5x10 <sup>4</sup> conidies/ml]	Quantité de solution de glycérol 5% (ml)
T1	8 (jour 1)	0	0
T2	0	8 (jour 1)	0
T3	4 (jour 1)	4 (jour 1)	0
T4	8 (jour 1)	8 (jour 4)	0
T5	8 (jour 1) et 8 (jour 4)	0	0
T6	4 (jour 1)	0	4
T7	0	4 (jour 1)	4
T8	0	0	8 (jour 1)

Composition de l'inoculum de 8 traitements avec des proportions variables de conidies de *B. squamosa*, *B. cinerea* et du glycérol à 5%. Le jour de l'inoculation est spécifié entre parenthèses.

Le témoin positif auquel on compare les autres traitements dans cette expérience est une dose « standard » d'inoculum de *B. squamosa* (7.5x10<sup>4</sup> conidies/ml, traitement #1). En fonction des expériences réalisées dans le chapitre 2 (section 2.3.5), il est attendu que ce traitement génère une certaine quantité de dommages. Le traitement T4 (inoculation «standard » de *B. squamosa* au jour 1, suivi d'une inoculation «standard » de *B. cinerea* au jour 4) est considéré comme le traitement phare de l'expérience. C'est ce traitement qui teste directement l'hypothèse de travail. Les autres traitements servent à mesurer les autres effets, tels que l'effet d'une seconde inoculation ou l'effet de la concentration de l'inoculum.

### *3.2.6 Test de sévérité des symptômes sur des plants d'oignons*

Suivant une version modifiée de la méthode décrite dans Carisse et Tremblay (2007) et explicitée au chapitre 2 (section 2.3.5), des oignons (cv. “Cartier”) cultivés durant 5 semaines dans une chambre de croissance à 20°C, avec une humidité relative (HR) de 70% et une photopériode de 16h ayant atteint le stade de croissance de 4-5 feuilles ont été placés individuellement dans des tours d'inoculation. 100 ml d'eau ont été ajoutés dans une soucoupe au bas des tours pour assurer un approvisionnement constant durant la période d'incubation.

Les 10 aliquots par traitement expérimental ont été vaporisés un à la suite de l'autre dans les 10 tours identifiées à cet effet à l'aide d'un vaporisateur de type « air brush » à une pression constante de 170 kPa. Entre chaque traitement, le vaporisateur a été rincé avec 20 ml d'une solution de glycérol à 5%. Les tours ont par la suite été scellées à l'aide d'un morceau de ruban adhésif et placées dans 2 chambres de croissance (5 plants par traitement par chambre de croissance Conviron) en suivant une disposition en blocs complets aléatoires. Durant la période de germination de 24h, les chambres de croissance ont été maintenues à 100% HR avec une photopériode de 10h. L'incubation s'est ensuite poursuivie sans les capuchons sur les tours durant une période d'infection de 48h à 18°C avec une HR de 75%.

Après 72h d'incubation, les tours contenant les oignons des traitements 4 et 5 ont été sorties des chambres de croissance et réinoculées avec les solutions de conidies additionnelles décrites plus haut. Les tours ont ensuite été replacées dans les chambres de croissance et l'incubation s'est poursuivie en maintenant des conditions propices à la germination durant 24h puis à l'infection durant 72h.

La sévérité des symptômes causée par les différents traitements a été évaluée selon deux aspects: le nombre de lésions sur les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> vraies feuilles et le pourcentage (%) de chlorose sur ces mêmes feuilles, c'est-à-dire le nombre de centimètres de feuille chlorosées sur la longueur totale de la feuille.



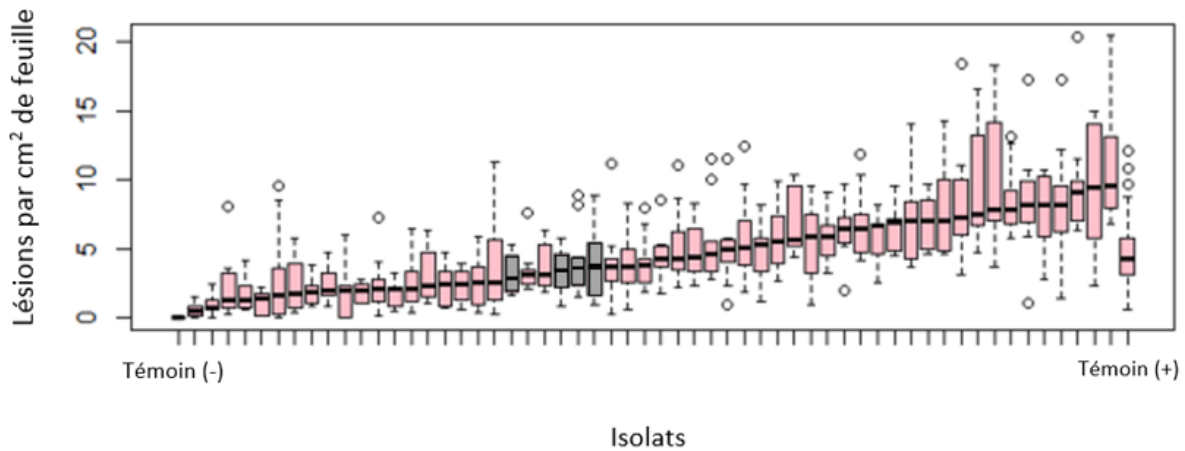
### 3.2.7 Analyses statistiques

Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée afin de confirmer la validité et l'utilisation des moyennes des répliques et le regroupement des répétitions. La normalité des distributions a été vérifiée à l'aide du test Shapiro-Wilk. Par la suite, les traitements ont été comparés entre eux grâce au test de comparaison multiple de Tukey (HSD) avec un intervalle de confiance fixé à 95%. Un test de comparaison multiple de Dunnett a aussi été effectué pour comparer les traitements (T2 à T8) au contrôle positif (traitement T1).

## 3.3 Résultats

En premier lieu, les tests qPCR spécifiques aux espèces *B. squamosa* et *B. cinerea* réalisés sur la collection d'isolats 2020 ont permis d'identifier 87 isolats appartenant à l'espèce *B. squamosa* et 145 isolats à l'espèce *B. cinerea*.

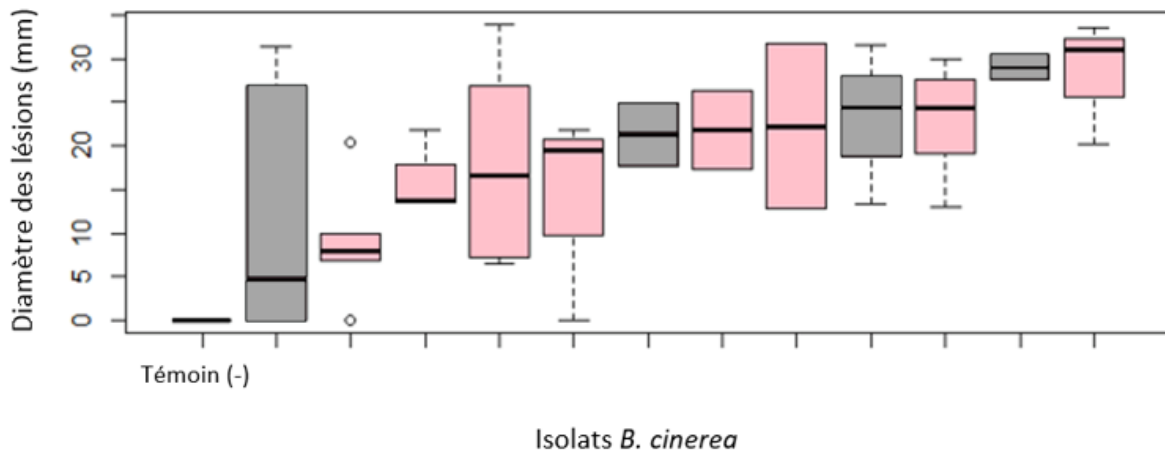
En second lieu, le résultat des tests d'agressivité réalisés avec les isolats de *B. squamosa* a permis de les classer selon leur capacité à causer des lésions sur les plants d'oignons tel que présenté ci-dessous (figure 3.2). Après une classification hiérarchique, les quatre isolats suivants parmi les isolats ayant été catégorisé ayant une agressivité « moyenne » ont été sélectionnés aléatoirement : « 125.2 », « 75.1 », « 134.2 » et « 136.2 ».



**Figure 3.2 : Agressivité de 59 isolats de *B. squamosa* sur des plants d'oignons**

Lésions par cm<sup>2</sup> de feuilles causées par l'inoculation de 59 isolats de l'espèce *B. squamosa* sur des plants d'oignons au stade 4-5 feuilles après 5 jours d'incubation. L'erreur type est représentée par la barre d'erreur. Les isolats en gris ont été sélectionnés aléatoirement parmi les isolats ayant une agressivité « moyenne » pour faire partie du mélange « *B. squamosa* »

Le résultat des tests d'agressivité réalisés avec les isolats de *B. cinerea* ont permis de les classer selon leur croissance radiale sur des feuilles d'oignons détachées (figure 3.3). Après l'exclusion des isolats le plus agressif et le moins agressif, les quatre isolats suivants ont été sélectionnés aléatoirement : «54.1», « 80.1», « 67.1» et « 72.1».

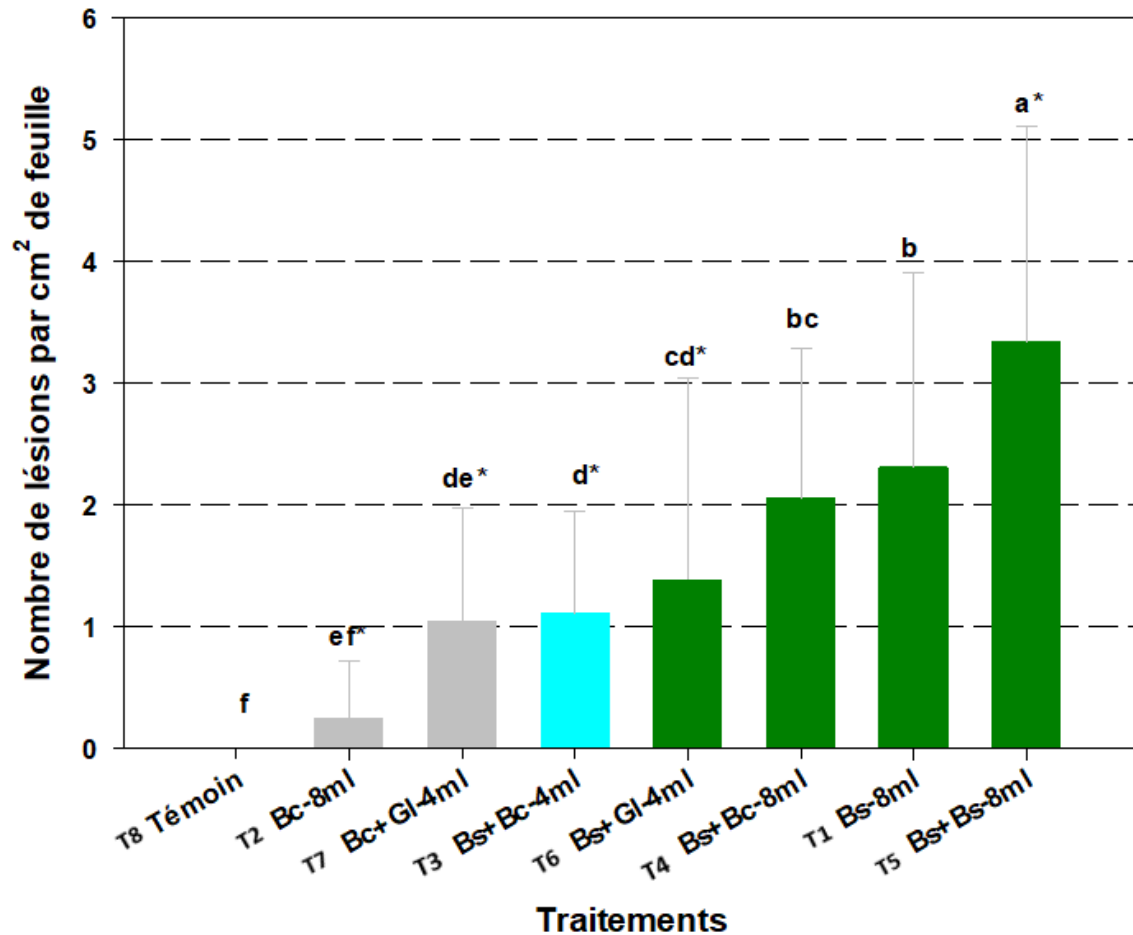


**Figure 3.3 : Agressivité de 13 isolats de *B. cinerea* sur des feuilles d'oignons**

Moyenne des diamètres de croissance radiale de 13 isolats de *B. cinerea* sur des feuilles détachées d'oignons. Les isolats «54.1», « 80.1», « 67.1» et « 72.1» en gris ont été sélectionnés aléatoirement parmi les isolats ayant une agressivité « moyenne » pour faire partie du mélange « *B. cinerea* »

Pour ce qui est des tests de sévérité des symptômes, il a été décidé d'utiliser l'ANOVA, bien que les données de certains traitements n'étaient pas normalement distribuées ( $P < 0.05$  dans le test de normalité Shapiro-Wilk pour les traitements T2, T6 et T7) afin de maintenir l'esprit du dispositif expérimental et favoriser l'interprétation biologique des données.

Les résultats des tests de sévérité des symptômes sur des plants d'oignons ont révélé trois aspects importants. Premièrement, les comparaisons post-hoc de Dunnett suggèrent que le seul traitement qui n'était pas significativement différent du traitement T1 (dose « standard » d'inoculum « *B. squamosa* ») était le traitement T4 (dose « standard » d'inoculum « *B. squamosa* » en plus d'une dose « standard » d'inoculum « *B. cinerea* » au jour 4) tel qu'illustré par l'absence d'astérisque (\*) (figure 3.4).



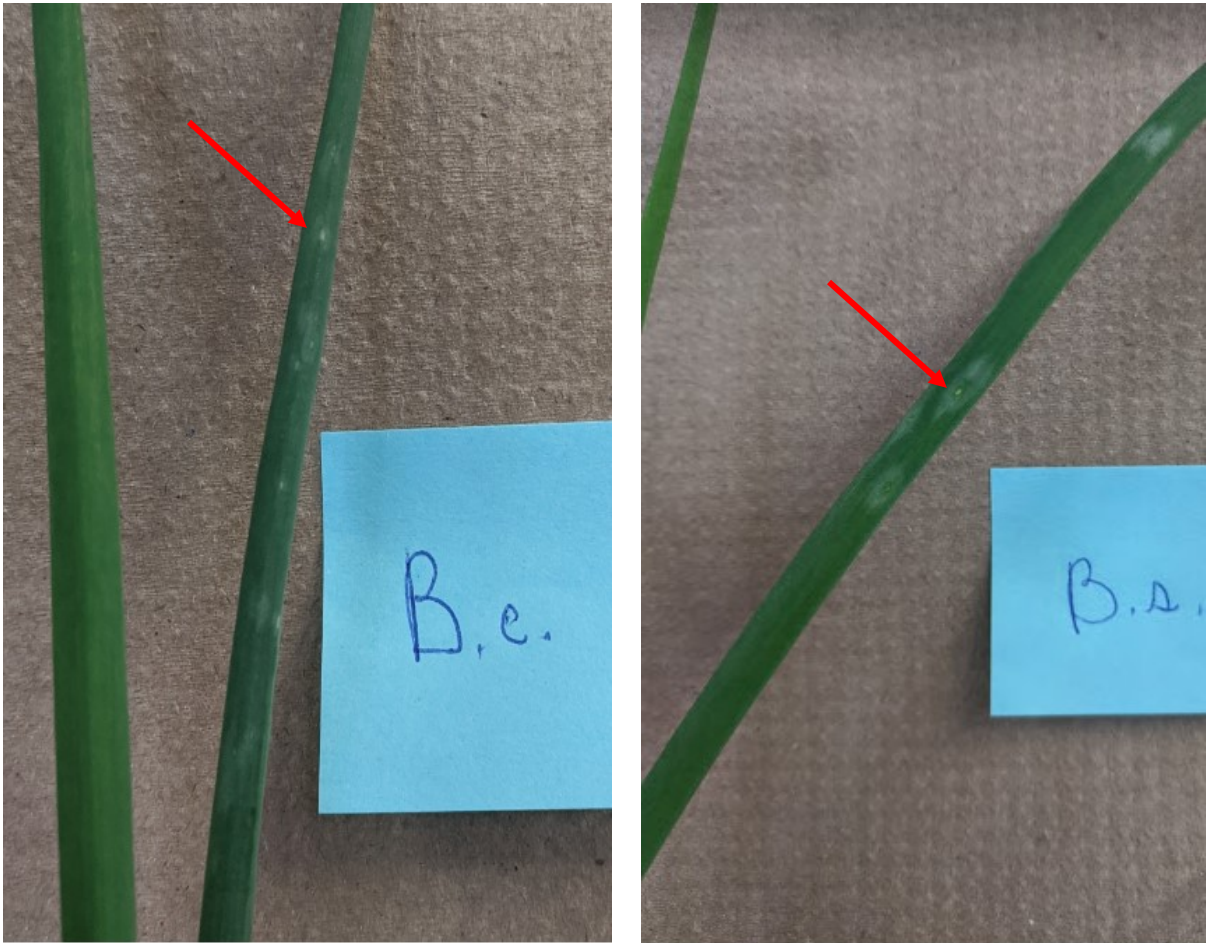
**Figure 3.4 : Lésions par cm<sup>2</sup> produites par différents traitements de *B. squamosa* et *B. cinerea* sur des plants d'oignons**

Nombre de lésions par cm<sup>2</sup> de feuilles causées par différents ratios d'inoculum de *B. squamosa* et *B. cinerea* sur des plants d'oignons au stade 4-5 feuilles. Les traitements avec les concentrations en conidies les plus élevées sont représentées par les « 8 ml », tandis que les demi-doses sont représentées par les « 4 ml ». « Gl » représente l'utilisation de glycérol pour arriver à la concentration de demi dose lorsqu'une seule espèce était utilisée. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey. Les astérisques représentent les traitements significativement différents du T1 selon les comparaisons post-hoc de Dunnett. L'évaluation des symptômes a été effectuée après neuf jours d'incubation en conditions contrôlées.

Deuxièmement, le test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) illustré par l'utilisation de lettre sur la figure 3.4 révèle que plusieurs traitements ne sont pas significativement différents les uns des autres, bien que tous les traitements sauf le traitement T2 différaient significativement du contrôle négatif T8. Troisièmement, les traitements constitués uniquement d'inoculum *B. cinerea* ont généré des lésions (figure 3.4). Les tables des tests post-hoc sont disponibles en annexe (Tableau T1 et T2).

Lorsque le pourcentage de chlorose était évalué, les analyses n'ont montré aucune différence significative entre les traitements.

L'aspect visuel des symptômes a aussi été répertorié (figure 3.5). On remarque que certaines lésions causées par les deux espèces de *Botrytis* sont indifférenciables.



**Figures 3.5: Symptômes attribuables à *B. cinerea* et *B. squamosa* sur des plants d'oignons**

Symptômes attribuables à *B. cinerea* (gauche) (T2) et *B. squamosa* (droite) (T1) 9 jours après l'inoculation des plants d'oignons avec des conidies. Les symptômes caractérisés par une chlorose entourée d'un halo blanc sont identiques à l'œil nu.

### 3.4 Discussion

L'expérience décrite dans ce chapitre avait pour but de documenter l'effet de *B. cinerea* dans la sévérité de symptômes causés par la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon. À la lumière des résultats obtenus, l'hypothèse proposée selon laquelle la présence de conidies de *B. cinerea* dans l'inoculum ou leur ajout sur des plants d'oignons ayant déjà des symptômes de brûlure de la feuille de l'oignon amplifie les symptômes de brûlure de la feuille a été rejetée. En effet, la sévérité des symptômes observés sur le traitement T4 où une dose complète d'inoculum composé entièrement de conidies appartenant à l'espèce *B. cinerea* a été vaporisé sur des plants ayant reçu une dose complète d'inoculum de *B. squamosa* 4 jours plus tôt est équivalente à la sévérité des dommages observés sur le traitement T1 (correspondant à une dose initiale complète d'inoculum *B. squamosa*). Ainsi, on peut en conclure à l'absence d'effet de la présence de *B. cinerea* dans l'inoculum sur la sévérité des symptômes de dommages observés sur des plants ayant déjà subi des dommages associés à brûlure de la feuille de l'oignon.

De façon générale, il semble que le facteur influençant le plus la quantité de dommages observés sur les plants soit le nombre de conidies totales appartenant à l'espèce *B. squamosa* vaporisées. Ainsi, si on s'attarde aux traitements T1, T3, T5 et T6, on observe un nombre de lésions par cm<sup>2</sup> proportionnel à la concentration de l'inoculum en conidies de *B. squamosa*. Cette observation est cohérente avec des essais similaires répertoriés dans la littérature (Carisse et al., 2005).

Bien que l'hypothèse initiale ait été rejetée, certains résultats obtenus sont étonnants. En effet, il semblerait que l'espèce *B. cinerea* soit capable de causer des dommages visuellement identiques à ceux causés par l'espèce *B. squamosa* sur des plants d'oignons (voir figure 3.5), mais ce, de façon inconstante. En effet, il a été observé qu'après la période d'incubation, certains plants n'affichaient aucune lésion tandis que d'autres oui. De plus, il n'y a pas de relation proportionnelle observable entre le nombre de conidies appliquées sur les plants et la quantité de dommages contrairement à ce qui a été observé pour les traitements avec *B. squamosa*. Cela soulève des questions quant au processus d'infection de *B. cinerea* dans les feuilles d'oignons. En premier lieu, il a été démontré que certaines espèces appartenant au genre *Botrytis* peuvent pénétrer des feuilles d'oignons par différentes voies. Par exemple, *B. squamosa* peut pénétrer

les feuilles entre les cellules épidermiques ou par les stomates (Steentjes et al., 2021a). La voie d'infection préconisée dépend entre autres des effecteurs libérés par le phytopathogène (Valero-Jiménez, 2020), mais aussi de l'accessibilité des différentes entrées. L'inconstance des symptômes causés par l'espèce *B. cinerea* pourrait potentiellement être expliquée par sa capacité à pénétrer les feuilles d'oignons via certaines voies, mais pas d'autres. En second lieu, comme le révélaient Clark et Lorbeer (1976), l'effet des nutriments azotés exogènes présents sur les feuilles pourrait potentiellement expliquer la présence de lésions causées par *B. cinerea*. Bien que tous les plants aient reçu les mêmes doses de nutriments en fertigation, il est possible que la concentration des nutriments sur et dans les plants ait différencié. En troisième lieu, il a été observé que certains champignons phytopathogènes pouvaient infecter des plantes hôtes de façon endophytique sans causer de dommages (Shaw et al., 2016). Selon les expériences de Shaw et al. (2016), l'apparition des symptômes causés par une infection dite « sibylline » par *B. cinerea* peuvent survenir lorsque la plante subit un stress physiologique ou simplement plus tard dans son développement. Malheureusement, le dispositif expérimental de l'expérience décrite dans ce chapitre ne permettait pas de détecter les infections latentes.

En somme, il serait intéressant dans une étude ultérieure d'observer le processus d'infection de cette espèce avec différentes techniques de microscopie tel qu'utilisé dans Steentjes et al. (2021a). Cela permettrait de répondre à des questions telles que « comment est-ce que *B. cinerea* pénètre dans les feuilles d'oignons? », « le ratio de chacune des espèces dans l'inoculum a-t-il un impact sur la capacité à infecter les feuilles? » et peut-être même « sous quelles conditions *B. cinerea* est-il capable de pénétrer des feuilles d'oignons? ».

Au-delà des considérations plus fondamentales à propos du mode d'infection de *B. cinerea* dans des feuilles d'oignons vivantes, la similarité des symptômes causés par *B. squamosa* et *B. cinerea* nous force à considérer les implications quant à l'interprétation des résultats de dépistage des symptômes au champ. À ce jour, la seule espèce étant reconnue pour causer les symptômes attribuables à la brûlure de la feuille de l'oignon est *B. squamosa* (Walker 1925a). Les résultats de l'expérience décrite ici montrent d'ailleurs que la quantité de conidies de cette espèce dans l'inoculum est le facteur le plus important pour prédire les dommages associés à la brûlure de la feuille de l'oignon. Ainsi, lorsque des taches de brûlure de la feuille sont observées



au champ, on suppose qu'elles sont causées par l'espèce *B. squamosa* et qu'elles engendrent des dommages conformes à ce qu'on connaît de cette espèce, soit une dégradation rapide des feuilles en brûlure des pointes et une réduction importante de l'habileté à faire de la photosynthèse (Carisse et al., 2011). Par contre, la présente étude démontre que ces symptômes peuvent, dans certains cas, être causés par une autre espèce, soit *B. cinerea*, mais que la présence de *B. cinerea* dans l'inoculum ne mène pas nécessairement à l'aggravation des symptômes de brûlure. Ainsi, il est possible qu'on décide plus fréquemment d'appliquer un fongicide pour contrôler la maladie lorsque les décisions sont basées uniquement sur le dépistage des symptômes pour estimer l'importance du pathogène dans l'environnement.

Il reste encore plusieurs questions quant à l'effet à plus long terme d'une infection par *B. cinerea* sur les plants d'oignons. Par exemple, il faudrait évaluer le cycle d'infection sur une plus grande période que neuf jours et évaluer les possibilités d'infections latentes (et notre capacité à les détecter) afin de mieux modéliser et comprendre ce pathosystème. Bien que les espèces présentes dans l'inoculum utilisé aient été confirmées par qPCR, il faudrait aussi réisoler les lésions sur les plants symptomatiques et reconfirmer l'identité des espèces afin de dissiper tout doute sur l'agent responsable des dommages. Le dispositif expérimental pourrait aussi être modifier pour favoriser les infections par *B. cinerea*, par exemple en testant des concentrations de conidies plus élevées ou bien ou en modifiant les stress (hydriques, froid) subit par les plantes. Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'étudier les mécanismes d'infections au niveau moléculaire de *B. cinerea* sur les oignons. Globalement, cela met en valeur l'importance du suivi moléculaire des épidémies de *B. squamosa* et la justesse des recommandations agronomiques qui en découlent (Van der Heyden 2012).



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION ET CONCLUSION

#### 4.1 Retour sur les résultats

Cette recherche avait pour but de répondre aux questions suivantes: (1) y a-t'il un coût d'adaptation (l'agressivité moindre) chez *B. squamosa* associé à la résistance aux fongicides? Et dans une moindre mesure, (2) la présence de *B. cinerea* dans l'inoculum amplifie-t-il les symptômes associés à la brûlure de la feuille de l'oignon?

En premier lieu, l'étude de la résistance aux fongicides d'isolats de *B. squamosa* a révélé que des niveaux de résistance variables ont été détectés pour presque toutes les matières actives testées. Cela concorde avec ce qui est observé dans d'autres pathosystèmes similaires où l'utilisation de fongicides à haut risque mène presque qu'en tout temps à l'augmentation de la résistance dans les populations d'agents pathogènes visés. Les cas de *B. cinerea* dans la production de fraise et la vigne sont bien documentés, mais aussi chez *S. vesicarium* dans la production d'oignon où le champignon a été soumis essentiellement aux mêmes fongicides que *B. squamosa*. Dans la présente étude, une incidence de la résistance de plus de 75% a été détectée pour le boscalide, le fluopyram, le difénoconazole, le fluxapyroxade et la picoxystrobine. Dans une moindre mesure, les niveaux de résistance étaient de 60.9% pour la pyraclostrobine et de 39.1% pour le pyriméthanil. Bien qu'il soit impossible de comparer directement ces résultats avec d'autres travaux, des niveaux élevés de résistance menacent potentiellement grandement l'efficacité des fongicides et mériteraient une attention particulière afin de freiner l'augmentation de la résistance. Une baisse d'efficacité des fongicides mène souvent à leur application en plus grande quantité ou en doses plus concentrées, ce qui monopolise de précieuses ressources tant au niveau environnemental que financier. Les résultats obtenus ici permettront à de futures études de suivre l'évolution de la résistance aux fongicides chez *B. squamosa* et d'adapter les stratégies anti-résistance en fonction de cette évolution. Des actions telles que le retrait de certaines matières actives pour certaines cultures ou l'obligation de les

utiliser en mélange avec d'autres groupes de fongicides pourraient être envisagées. Par ailleurs, aucun coût d'adaptation n'a pu être mesuré quant à la capacité de *B. squamosa* à causer des lésions sur des plants d'oignons et ce, malgré une vaste gamme d'agressivité parmi les isolats testés. Bien que peu d'études portent sur les coûts d'adaptation en général, les résultats obtenus ici suivent les mêmes tendances que ceux rapportés par Carisse et Tremblay (2003) pour la résistance de *B. squamosa* à l'iprodione.

En deuxième lieu, les expériences de co-infection entre *B. squamosa* et *B. cinerea* ont révélé que la présence de *B. cinerea* dans l'inoculum pendant ou après une infection de *B. squamosa* n'amplifiait pas les dommages de brûlure de la feuille de l'oignon. Ces expériences de co-infections, bien qu'ayant peu d'échos dans la littérature, concordent avec les observations qui veulent que *B. cinerea* ne peut pas causer la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon. Par contre, on a révélé que *B. cinerea* pouvait, de façon inconstante, causer des lésions visuellement identiques à *B. squamosa*, ce qui soulève certaines questions quant au dépistage de la maladie. Par contre, la portée de cette étude s'est révélée limitée, notamment à cause de la non-normalité de la distribution de certaines données. Si l'étude était à répéter, il serait aussi intéressant de la refaire, mais dans des conditions environnementales sous-optimales. L'été 2020 a été chaud et sec et c'est dans ces conditions que la collection, qui contient une grande proportion d'isolats appartenant à l'espèce *B. cinerea*, a été isolée. Dans le contexte des changements climatiques, il est attendu d'observer plus d'épisodes de sécheresse. Est-ce que des températures plus élevées et une humidité relative plus basse pourraient favoriser *B. cinerea* au détriment de *B. squamosa*? La question se pose et mériterait d'être adressée grâce à une collection d'isolats provenant d'années caractérisées par des conditions climatiques différentes.

Les résultats obtenus au cours de ce projet mènent à certaines retombées scientifiques et pratiques intéressantes, notamment au sujet de la gestion de la résistance aux fongicides. Dans certaines études, le fait de rejeter son hypothèse initiale ou de ne trouver "aucun effet" est décevant et permet, au mieux, d'explorer de nouvelles avenues de recherches. Par contre, dans le présent projet, le fait de ne pas avoir trouvé de coût d'adaptation associé à l'agressivité pour la résistance aux fongicides chez *B. squamosa* est un résultat intéressant en soi. Il ébranle certaines théories ou idées préconçues à l'égard de la gestion de la résistance aux fongicides qui

assument que la résistance est un phénomène réversible. Bien qu'un coût d'adaptation puisse s'exprimer autrement que par la capacité à causer des lésions, les résultats observés ici rappellent que son existence n'est pas assurée. En d'autres mots, la résistance aux fongicides n'est pas nécessairement réversible, même si on arrête d'utiliser certains fongicides. Ces résultats pourront servir de base à des études à plus grande échelle au niveau territorial et dans le temps et permettront éventuellement aux producteurs, aux conseillers agronomiques et aux législateurs d'avoir une analyse plus compréhensive de l'enjeu de la résistance aux fongicides et de proposer des solutions de réduction d'utilisation de fongicides adaptées à la réalité des agents pathogènes visés.

Pour ce qui est des résultats obtenus lors de l'étude des co-infections par *B. squamosa* et *B. cinerea*, ils renforcent l'idée que l'utilisation de *B. squamosa* comme agent pathogène clé dans les programmes d'application de fongicides est approprié. Ils révèlent aussi les limitations quant à l'interprétation des résultats issus du dépistage de la maladie de la brûlure de la feuille de l'oignon. Bien que cette recherche était orientée de façon à répondre à des questions plus pratiques en ce qui à trait, notamment, à la gestion de la maladie, elle a aussi révélé le manque de connaissances au sujet des interactions entre plusieurs agents pathogènes dans le pathosystème de l'oignon.

## **4.2 Conclusion**

Globalement, les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 de ce projet soulèvent des questions intéressantes pour de futures études. En outre, il faudrait explorer plus amplement les dynamiques de co-infections pour répondre à des questions quant à l'importance des infections multiples dans les pathosystèmes de l'oignon et de leur impact dans le développement des maladies. De façon plus importante, les résultats ont aussi mis en lumière la nécessité de se pencher sur la question de la durée de vie utile des fongicides unisites et à leur habileté à contrôler la maladie de la brûlure de la feuille à moyen et long terme. Jusqu'à quand les fongicides resteront-ils efficaces en les utilisant selon les programmes d'application actuels? Il

manque d'études appliquées pour répondre à ces questions qui ont un impact direct sur la façon de produire des oignons au pays.



## ANNEXE

**Tableau T1 : Test post-hoc de Tukey sur lésions par cm<sup>2</sup> produites par différents traitements de *B. squamosa* et *B. cinerea* sur des plants d'oignons**

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
T5 vs T8	3.344	12.364	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T5 vs T2	3.090	11.427	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T5 vs T7	2.297	8.494	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T5 vs T3	2.230	8.246	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T5 vs T6	1.957	7.235	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T5 vs T4	1.289	4.765	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T5 vs T1	1.034	3.822	3.052	<b>0.004</b>	Oui
T1 vs T8	2.310	8.542	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T1 vs T2	2.057	7.605	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T1 vs T7	1.264	4.672	3.052	<b>0.000</b>	Oui
T1 vs T3	1.196	4.424	3.052	<b>0.000</b>	Oui
T1 vs T6	0.923	3.414	3.052	<b>0.016</b>	Oui
T1 vs T4	0.255	0.943	3.052	0.981	Non
T4 vs T8	2.055	7.599	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T4 vs T2	1.801	6.661	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T4 vs T7	1.008	3.729	3.052	<b>0.006</b>	Oui
T4 vs T3	0.941	3.481	3.052	<b>0.013</b>	Oui
T4 vs T6	0.668	2.470	3.052	0.212	Non
T6 vs T8	1.387	5.129	3.052	< <b>0.0001</b>	Oui
T6 vs T2	1.133	4.191	3.052	<b>0.001</b>	Oui
T6 vs T7	0.340	1.259	3.052	0.913	Non
T6 vs T3	0.273	1.010	3.052	0.973	Non
T3 vs T8	1.114	4.118	3.052	<b>0.001</b>	Oui
T3 vs T2	0.860	3.181	3.052	<b>0.034</b>	Oui
T3 vs T7	0.067	0.248	3.052	1.000	Non
T7 vs T8	1.046	3.870	3.052	<b>0.003</b>	Oui
T7 vs T2	0.793	2.932	3.052	0.070	Non
T2 vs T8	0.254	0.938	3.052	0.982	Non
Valeur critique du d de Tukey :			4.316		



**Tableau T2: Test post-hoc de Dunnett sur les lésions par cm<sup>2</sup> produites par différents traitements de *B. squamosa* et *B. cinerea* sur des plants d'oignons en comparaison avec le témoin positif (T1)**

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Différence critique	Pr > Diff	Significatif
T1 vs T5	-1.034	-3.822	2.613	0.707	<b>0.001</b>	Oui
T1 vs T8	2.310	8.542	2.613	0.707	<b>&lt; 0.0001</b>	Oui
T1 vs T2	2.057	7.605	2.613	0.707	<b>&lt; 0.0001</b>	Oui
T1 vs T7	1.264	4.672	2.613	0.707	<b>&lt; 0.0001</b>	Oui
T1 vs T3	1.196	4.424	2.613	0.707	<b>&lt; 0.0001</b>	Oui
T1 vs T6	0.923	3.414	2.613	0.707	<b>0.004</b>	Oui
T1 vs T4	0.255	0.943	2.613	0.707	0.888	Non



## BIBLIOGRAPHIE

- Abdullah, A. S., C. S. Moffat, F. J. Lopez-Ruiz, M. R. Gibberd, J. Hamblin, and A. Zerihun. 2017. Host–Multi-Pathogen Warfare: Pathogen Interactions in Co-infected Plants. *Frontiers in Plant Science* 8:1806.
- Ajouz, S., P. C. Nicot, and M. Bardin. 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology* 59:556–566.
- Allen, R. C., J. Engelstädter, S. Bonhoeffer, B. A. McDonald, and A. R. Hall. 2017. Reversing resistance: different routes and common themes across pathogens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284:20171619.
- Amiri, A., A. I. Zuniga, and N. A. Peres. 2020. Mutations in the Membrane-Anchored *SdhC* Subunit Affect Fitness and sensitivity to Succinate Dehydrogenase Inhibitors in *Botrytis cinerea* Populations from Multiple Hosts. *Phytopathology* 110:327–335.
- Avenot, H. F., and T. J. Michailides. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29:643–651.
- Bartlett, D. W., J. M. Clough, J. R. Godwin, A. A. Hall, M. Hamer, and B. Parr-Dobrzanski. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58:649–662.
- Basener, W. F., and J. C. Sanford. 2018. The fundamental theorem of natural selection with mutations. *Journal of Mathematical Biology* 76:1589–1622.
- Belden, J., S. McMurry, L. Smith, and P. Reilley. 2010. Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2477–2480.
- Billard, A., S. Fillinger, P. Leroux, H. Lachaise, R. Beffa, and D. Debieu. 2011. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science* 68:684–691.
- Boivin, G., and P. Sauriol. 1984. Dispersion statistics and sequential sampling plan for leaf blight caused by *Botrytis squamosa* in onions. *Phytopathology* 74:1385–1387.
- Bowyer, P., and D. W. Denning. 2014. Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. *Pest Management Science* 70:173–178.
- CAPER. 2020. Examiner les impacts des pesticides sur la santé publique et l'environnement, ainsi que les pratiques de remplacement innovantes disponibles et à venir dans les secteurs de l'agriculture et de l'alimentation, et ce en reconnaissance de la compétitivité du secteur agroalimentaire québécois. Assemblée nationale du Québec. URL :

<https://www.assnat.qc.ca/fr/travaux-parlementaires/commissions/capern/mandats/Mandat-40773/index.html>

Carisse, O., A. Levasseur, and H. V. der Heyden. 2012. A new risk indicator for botrytis leaf blight of onion caused by *Botrytis squamosa* based on infection efficiency of airborne inoculum. *Plant Pathology* 61:1154–1164.

Carisse, O., H. A. McCartney, J. A. Gagnon, and L. Brodeur. 2005. Quantification of Airborne Inoculum as an Aid in the Management of Leaf Blight of Onion Caused by *Botrytis squamosa*. *Plant Disease* 89:726–733.

Carisse, O., N. McRoberts, and L. Brodeur. 2008. Comparison of monitoring- and weather-based risk indicators of botrytis leaf blight of onion and determination of action thresholds. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30:442–456.

Carisse, O., D. Rolland, and D.-M. Tremblay. 2006. Effect of *Microsphaeropsis ochracea* on Production of Sclerotia-borne and Airborne Conidia of *Botrytis squamosa*. *Biocontrol* 51:107–126.

Carisse, O., and D. M. Tremblay. 2007. Incidence and Significance of Iprodione-Insensitive Isolates of *Botrytis squamosa*. *Plant Disease* 91:41–46.

Carisse, O., D. M. Tremblay, and A. Lefebvre. 2014. Comparison of *Botrytis cinerea* airborne inoculum progress curves from raspberry, strawberry and grape plantings. *Plant Pathology* 63:983–993.

Carisse, O., D. M. Tremblay, C. A. Lévesque, K. Gindro, P. Ward, and A. Houde. 2009. Development of a TaqMan Real-Time PCR Assay for Quantification of Airborne Conidia of *Botrytis squamosa* and Management of *Botrytis* Leaf Blight of Onion. *Phytopathology* 99:1273–1280.

Carisse, O., D.-M. Tremblay, M. R. McDonald, L. Brodeur, and N. McRoberts. 2011. Management of *Botrytis* Leaf Blight of Onion: The Québec Experience of 20 Years of Continual Improvement. *Plant Disease* 95:504–514.

Cawoy, H., D. Debois, L. Franzil, E. De Pauw, P. Thonart, and M. Ongena. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology* 8:281–295.

Chen, S. N., C. X. Luo, M. J. Hu, and G. Schnabel. 2016. Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Isolates with Resistance to Multiple Chemical Classes of Fungicides. *Phytopathology* 106:997–1005.

Chilvers, M. I., and L. J. du Toit. 2006. Detection and Identification of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot, Scape Blight, and Umbel Blight of Onion. *Plant Health Progress* 7:38.

Clark, C. A., and J. W. Lorbeer. 1976. Comparative Histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on Onion Leaves. *Phytopathology* 66:1279–1289.

- Cui, W., R. E. Beever, S. L. Parkes, P. L. Weeds, and M. D. Templeton. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology* 36:187–198.
- de Visser, C. L. M. 1996. Field evaluation of a supervised control system for *Botrytis* leaf blight in spring sown onions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 102:795–805.
- Delmas, C. E. L., Y. Dussert, L. Delière, C. Couture, I. D. Mazet, S. R. Cervera, and F. Delmotte. 2017. Soft selective sweeps in fungicide resistance evolution: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. *Molecular Ecology* 26:1936–1951.
- Elderfield, J. A. D., F. J. Lopez-Ruiz, F. van den Bosch, and N. J. Cunniffe. 2018. Using Epidemiological Principles to Explain Fungicide Resistance Management Tactics: Why do Mixtures Outperform Alternations? *Phytopathology* 108:803–817.
- Ellerbrock, L. A., and J. W. Lorbeer. 1977. Source of Primary inoculum of *Botrytis squamosa*. *Phytopathology* 67:363–372.
- Fan, F., W. X. Yin, G. Q. Li, Y. Lin, and C. X. Luo. 2018. Development of a LAMP Method for Detecting SDHI Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 102:1612–1618.
- Fisher, M. C., N. J. Hawkins, D. Sanglard, and S. J. Gurr. 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360:739–742.
- Fitt, B. D. L., Y.-J. Huang, F. van den Bosch, and J. S. West. 2006. Coexistence of Related Pathogen Species on Arable Crops in Space and Time. *Annual Review of Phytopathology* 44:163–182.
- Forsberg, K., K. Woodworth, M. Walters, E. L. Berkow, B. Jackson, T. Chiller, and S. Vallabhaneni. 2019. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Medical Mycology* 57:1–12.
- Gilchrist, M. A., D. L. Sulsky, and A. Pringle. 2006. Identifying Fitness and Optimal Life-history Strategies for and Asexual Filamentous Fungus. *Evolution* 60(5):970-979.
- Gobeil-Richard, M., D.-M. Tremblay, C. Beaulieu, H. V. der Heyden, and O. Carisse. 2016. A pyrosequencing-based method to quantify genetic substitutions associated with resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botrytis spp.* populations. *Pest Management Science* 72:566–573.
- Gossen, B. D., O. Carisse, L. M. Kawchuk, H. V. D. Heyden, and M. R. McDonald. 2014. Recent changes in fungicide use and the fungicide insensitivity of plant pathogens in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 36:327–340.
- Hagerty, C. H., N. P. Anderson, and C. C. Mundt. 2016. Temporal Dynamics and Spatial Variation of Azoxystrobin and Propiconazole Resistance in *Zymoseptoria tritici*: A Hierarchical Survey of Commercial Winter Wheat Fields in the Willamette Valley, Oregon. *Phytopathology* 107:345–352.

- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7:133–141.
- Hancock, J. G., and J. W. Lorbeer. 1963. Pathogenesis of *Botrytis cinerea*, *B. squamosa*, and *B. alli* on onion leaves. *Phytopathology* 53:669–673.
- Hart, S. P., R. P. Freckleton, and J. M. Levine. 2018. How to quantify competitive ability. *Journal of Ecology* 106:1902–1909.
- Hawkins, N. J., and B. A. Fraaije. 2018. Fitness Penalties in the Evolution of Fungicide Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 56:339–360.
- Hickman, C. J., and D. Ashworth. 1943. The occurrence of *Botrytis spp.* on onion leaves with special reference to *B. squamosa*. *Br. Mycol. Soc. Trans* 26:153–157.
- Hobbelen, P. H. F., N. D. Paveley, and F. van den Bosch. 2014. The Emergence of Resistance to Fungicides. *PLOS ONE* 9:e91910.
- Hollomon, D. W., and H. Ishii. 2015. Monitoring Resistance Using Molecular Methods. Pp. 295–309 in H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Springer Japan, Tokyo.
- Hsiang, T., L. Yang, and W. Barton. 1998. Relative virulence of isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* with varying sensitivity to propiconazole. *European Journal of Plant Pathology* 104:163–169.
- Institut de la statistiques du Québec, Québec (Province), and des pêcheries et de l'alimentation Ministère d'agriculture. 2016. Profil sectoriel de l'industrie horticole au Québec. Consulté le 21 juillet 2022. URL : <https://statistique.quebec.ca/fr/document/profil-sectoriel-de-lindustrie-horticole-au-quebec>
- Karaoglanidis, G. S., A. N. Markoglou, G. A. Bardas, E. G. Doukas, S. Konstantinou, and J. F. Kalampokis. 2011. Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. *International Journal of Food Microbiology* 145:195–204.
- Kilani, J., and S. Fillinger. 2016. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Kozhar, O., M. M. Larsen, N. J. Grünwald, and T. L. Peever. 2020. Fungal Evolution in Anthropogenic Environments: *Botrytis cinerea* Populations Infecting Small Fruit Hosts in the Pacific Northwest Rapidly Adapt to Human-Induced Selection Pressures. *Applied Environmental Microbiology* 86(9): e02908-19
- Kretschmer, M., M. Leroch, A. Mosbach, A.-S. Walker, S. Fillinger, D. Mernke, H.-J. Schoonbeek, J.-M. Pradier, P. Leroux, M. A. D. Waard, and M. Hahn. 2009. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens* 5:e1000696.

- Kroetsch, D. J., X. Geng, S. X. Chang, and D. D. Saurette. 2011. Organic Soils of Canada: Part 1. Wetland Organic soils. *Canadian Journal in Soil Science* 91:807–822.
- Labrie, G., A.-È. Gagnon, A. Vanasse, A. Latraverse, and G. Tremblay. 2020. Impacts of neonicotinoid seed treatments on soil-dwelling pest populations and agronomic parameters in corn and soybean in Quebec (Canada). *PLOS ONE* 15:e0229136.
- Lacy, M., and J. W. Lorbeer. 2008. Neck rot. Pp. 47–49 in H. Schwartz and S.F. Mohan, eds. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. American Phytopathological society, Saint-Paul, Mn.
- Lalève, A., S. Fillinger, and A.-S. Walker. 2014. Fitness measurement reveals contrasting costs in homologous recombinant mutants of *Botrytis cinerea* resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. *Fungal Genetics and Biology* 67:24–36.
- Lenormand, T., N. Harmand, and R. Gallet. 2018. Cost of resistance: an unreasonably expensive concept. *Rethinking Ecology* 3:51–70.
- Leroux, P., F. Chapeland, D. Desbrosses, and M. Gredt. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18:687–697.
- Leroux, P., R. Fritz, D. Debieu, C. Albertini, C. Lanen, J. Bach, M. Gredt, and F. Chapeland. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58:876–888.
- Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A.-S. Walker. 2010. Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold. *Applied Environmental Microbiology* 76:6615–6630.
- Lévesque, A., C. Kermagoret, T. G. Poder, C. L'Ecuyer-Sauvageau, J. He, S. Sauvé, and J. Dupras. 2021. Financing on-farm ecosystem services in southern Quebec, Canada: A public call for pesticides reduction. *Ecological Economics* 184:106997.
- Li, H., W. Barlow, E. Dixon, B. F. Amsden, R. L. Hirsch, and E. E. Pfeufer. 2021. Molecular Identification of Mutations Conferring Resistance to Azoxystrobin in *Cercospora nicotianae*. *Plant Disease* 105:1272–1280.
- Liang, H., J. Li, C. Luo, J. Li, and F.-X. Zhu. 2019. Effects of SHAM on the Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to QoI Fungicides. *Plant Disease* 103:1884–1888.
- López-Villavicencio, M., F. Courjol, A. K. Gibson, M. E. Hood, O. Jonot, J. A. Shykoff, and T. Giraud. 2011. Competition, Cooperation Among Kin, and Virulence in Multiple Infections. *Evolution* 65:1357–1366.
- Lorbeer, J. W., A. M. Seyb, M. Boer, and J. E. Van den Ende. 2007. *Botrytis* species on bulb crops. Pp. 273–294 in Y. Elad et al. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer.

- Ma, Z., T. J. Proffer, J. L. Jacobs, and G. W. Sundin. 2006. Overexpression of the 14 $\alpha$ -Demethylase Target Gene (*CYP51*) Mediates Fungicide Resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4):2581-2585.
- Mair, W., F. Lopez-Ruiz, G. Stammer, W. Clark, F. Burnett, D. Hollomon, H. Ishii, T. S. Thind, J. K. Brown, B. Fraaije, H. Cools, M. Shaw, S. Fillinger, A.-S. Walker, E. Mellado, G. Schnabel, A. Mehl, and R. P. Oliver. 2016. Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. *Pest Management Science* 72:1449–1459.
- Malpica, J. M., S. Sacristán, A. Fraile, and F. García-Arenal. 2006. Association and Host Selectivity in Multi-Host Pathogens. *PLOS ONE* 1:e41.
- Maude, R. B., and A. H. Presly. 1977. Neck rot (*Botrytis allii*) of bulb onions. *Annals of Applied Biology* 86:181–188.
- Mernke, D., S. Dahm, A.-S. Walker, A. Lalève, S. Fillinger, M. Leroch, and M. Hahn. 2011. Two Promoter Rearrangements in a Drug Efflux Transporter Gene Are Responsible for the Appearance and Spread of Multidrug Resistance Phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* Isolates in French and German Vineyards. *Phytopathology* 101:1176–1183.
- Mertely, J. C., C. K. Chandler, C. L. Xiao, and D. E. Legard. 2000. Comparison of Sanitation and Fungicides for Management of *Botrytis* Fruit Rot of Strawberry. *Plant Disease* 84:1197–1202.
- Mikaberidze, A., and B. A. McDonald. 2015. Fitness Cost of Resistance: Impact on Management. Pp. 77–89 in H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Springer Japan, Tokyo.
- Mikaberidze, A., B. A. McDonald, and S. Bonhoeffer. 2013. Can High-Risk Fungicides be Used in Mixtures Without Selecting for Fungicide Resistance? *Phytopathology* 104:324–331.
- Misawa, T., and M. Takeuchi. 2015. Species composition of *Botrytis* leaf blight pathogens of Chinese chives and their seasonal and annual changes in Hokkaido, Japan. *Journal of General Plant Pathology* 81:218–225.
- Molaei, H., M. Abrinbana, and Y. Ghosta. 2020. Baseline sensitivities to azoxystrobin and tebuconazole in *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from sunflower in Iran related to sensitivities to carbendazim and iprodione. *Journal of Phytopathology* 168:353–362.
- Mouafo Tchinda, R. A., M. L. Fall, C. Beaulieu, and O. Carisse. 2022. Competition between *Plasmopara viticola* clade riparia and clade aestivalis: a race to lead grape downy mildew epidemics. *Plant Disease* 106(11):2866-2875.
- Nielsen, K., D. S. Yohalem, and D. F. Jensen. 2002. PCR Detection and RFLP Differentiation of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot of Onion. *Plant Disease* 86:682–686.
- Oshima, M., S. Banno, K. Okada, T. Takeuchi, M. Kimura, A. Ichiishi, I. Yamaguchi, and M. Fujimura. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene *BcOS1* in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Journal of Genetic Plant Pathology* 72:65–73.



- Pringle, A., and J. W. Taylor. 2002. The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology* 10:474–481.
- Radhakrishnan, G. V., N. M. Cook, V. Bueno-Sancho, C. M. Lewis, A. Persoons, A. D. Mitiku, M. Heaton, P. E. Davey, B. Abeyo, Y. Alemayehu, A. Badebo, M. Barnett, R. Bryant, J. Chatelain, X. Chen, S. Dong, T. Henriksson, S. Holdgate, A. F. Justesen, J. Kalous, Z. Kang, S. Laczny, J.-P. Legoff, D. Lesch, T. Richards, H. S. Randhawa, T. Thach, M. Wang, M. S. Hovmøller, D. P. Hodson, and D. G. O. Saunders. 2019. MARPLE, a point-of-care, strain-level disease diagnostics and surveillance tool for complex fungal pathogens. *BMC Biology* 17:65.
- Ramsey, R. G., and J. W. Lorbeer. 1985. Pathogenicity of *Botrytis* Species on Onion Umbels and Scapes Under Controlled Conditions. *Phytopathology* 76:604–612.
- Raposo, R., V. Gomez, T. Urrutia, and P. Melgarejo. 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* Associated with Dicarboximide Resistance. *Phytopathology* 90:1246–1249.
- Runkle, J., J. Flocks, J. Economos, and A. L. Dunlop. 2017. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environment International* 99:29–42.
- Rupp, S., R. W. S. Weber, D. Rieger, P. Detzel, and M. Hahn. 2017. Spread of *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture. *Frontiers in Microbiology* 7:2075.
- Russell, P. E. 2005. A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science* 143:11–25.
- Russell, P. E. 1995. Fungicide resistance: occurrence and management. *The Journal of Agricultural Science* 124:317–323.
- SAGe Pesticides. Consulté le 7 mai 2021. URL : <https://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/Resultats?clang=fr&cu=Oignon+sec&cid=36&elang=fr&tt=5&el=1483%3F2&ta=1&pc=6&p=1>
- Scalliet, G., J. Bowler, T. Luksch, L. Kirchhofer-Allan, D. Steinhauer, K. Ward, M. Niklaus, A. Verras, M. Csukai, A. Daina, and R. Fonné-Pfister. 2012. Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 7:e35429.
- Shao, W., Y. Zhao, and Z. Ma. 2021. Advances in Understanding Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology* 111:455–463.
- Shaw, M. W., C. J. Emmanuel, D. Emilda, R. B. Terhem, A. Shafia, D. Tsamaidi, M. Emblow, and J. A. L. van Kan. 2016. Analysis of Cryptic, Systemic *Botrytis* Infections in Symptomless Hosts. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Shoemaker, P. B. 1977. Timing Initial Fungicide Application to Control *Botrytis* Leaf Blight Epidemics on Onions. *Phytopathology* 77:409.

- Staats, M., P. van Baarlen, and J. A. L. van Kan. 2005. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22:333–346.
- Stammler, G., and J. Speakman. 2006. Microtiter Method to Test the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *Journal of Phytopathology* 154:508–510.
- Statistique Canada. 2021a. Valeur à la ferme des fruits et des légumes. Consulté le 8 septembre 2022. URL : <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/220210/dq220210d-fra.htm>
- Statistique Canada. 2021b. Aperçu statistique de l'industrie des légumes de plein champ et des champignons du Canada, 2020. Consulté le 8 septembre 2022. URL : <https://agriculture.canada.ca/fr/agriculture-agroalimentaire-canada/secteurs-agricoles-du-canada/horticulture/rapports-lindustrie-horticole/apercu-statistique-lindustrie-legumes-plein-champ-champignons-du-canada>
- Staub, T. 1991. Fungicide Resistance: Practical Experience with Antiresistance Strategies and the Role of Integrated Use. *Annual Review of Phytopathology* 29:421–442.
- Steentjes, M. B. F., O. E. Scholten, and J. A. L. van Kan. 2021a. Peeling the Onion: Towards a Better Understanding of *Botrytis* Diseases of Onion. *Phytopathology* 111:464–473.
- Steentjes, M. B. F., S. Tonn, H. Coolman, S. Langebeeke, O. E. Scholten, and J. A. L. van Kan. 2021b. Visualization of Three Sclerotiniaceae Species Pathogenic on Onion Reveals Distinct Biology and Infection Strategies. *Int J Mol Sci* 22:1865.
- Susi, H., B. Barrès, P. F. Vale, and A.-L. Laine. 2015. Co-infection alters population dynamics of infectious disease. *Nature Communications* 6:5975.
- Suzuki, F., J. Yamaguchi, A. Koba, T. Nakajima, and M. Arai. 2010. Changes in Fungicide Resistance Frequency and Population Structure of *Pyricularia oryzae* after Discontinuance of MBI-D Fungicides. *Plant Disease* 94:329–334.
- Toffolatti, S. L., G. Russo, D. Bezza, P. A. Bianco, F. Massi, D. Marcianò, and G. Maddalena. 2020. Characterization of fungicide sensitivity profiles of *Botrytis cinerea* populations sampled in Lombardy (Northern Italy) and implications for resistance management. *Pest Management Science* 76:2198–2207.
- Tollenaere, C., H. Susi, and A.-L. Laine. 2016. Evolutionary and Epidemiological Implications of Multiple Infection in Plants. *Trends Plant Science* 21:80–90.
- Tremblay, D. M., B. G. Talbot, and O. Carisse. 2003. Sensitivity of *Botrytis squamosa* to different classes of fungicides. *Plant Disease* 87:573–578.
- Valero-Jiménez, C. A., M. B. F. Steentjes, J. C. Slot, X. Shi-Kunne, O. E. Scholten, and J. A. L. van Kan. 2020. Dynamics in Secondary Metabolite Gene Clusters in Otherwise Highly Syntenic and Stable Genomes in the Fungal Genus *Botrytis*. *Genome Biology Evolution* 12:2491–2507.

- Van der Heyden, H., G. J. Bilodeau, O. Carisse, and J.-B. Charron. 2020. Monitoring of *Peronospora destructor* Primary and Secondary Inoculum by Real-Time qPCR. *Plant Disease* 104:3183–3191.
- Van der Heyden, H., O. Carisse, and L. Brodeur. 2012. Comparison of monitoring based indicators for initiating fungicide spray programs to control *Botrytis* leaf blight of onion. *Crop Protection* 33:21–28.
- Van der Heyden, H., P. Dutilleul, L. Brodeur, and O. Carisse. 2014. Spatial Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms Related to Fungicide Resistance and Implications for Sampling. *Phytopathology* 104:604–613.
- Veloukas, T., P. Kalogeropoulou, A. N. Markoglou, and G. S. Karaoglanidis. 2014. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. *Phytopathology* 104:347–356.
- Veloukas, T., M. Leroch, M. Hahn, and G. S. Karaoglanidis. 2011. Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. *Plant Disease* 95:1302–1307.
- Walker, A.-S., A. Micoud, F. Rémuson, J. Grosman, M. Gredt, and P. Leroux. 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science* 69:667–678.
- Walker, A.-S., V. Ravigne, A. Rieux, S. Ali, F. Carpentier, and E. Fournier. 2017. Fungal adaptation to contemporary fungicide applications: the case of *Botrytis cinerea* populations from Champagne vineyards (France). *Molecular Ecology* 26:1919–1935.
- Walker, J. C. 1925. Two undescribed species of *Botrytis* associated with the neck rot disease of onion bulbs. *Phytopathology* 15:708–713.
- Ward, E., S. J. Foster, B. A. Fraaije, and H. A. McCartney. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology* 145:1–16.
- Weeds, P. L., R. E. Beaver, and P. G. Long. 2000. Competition between aggressive and non-aggressive strains of *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) on French bean leaves. *Australasian Plant Pathology* 29:200–204.
- Whitelaw-Weckert, M. A., L. Rahman, L. M. Appleby, A. Hall, A. C. Clark, H. Waite, and W. J. Hardie. 2013. Co-infection by Botryosphaeriaceae and *Ilyonectria* spp. fungi during propagation causes decline of young grafted grapevines. *Plant Pathology* 62:1226–1237.
- Wood, P. M., and D. W. Hollomon. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science* 59:499–511.

Yin, W. X., M. Adnan, Y. Shang, Y. Lin, and C. X. Luo. 2018. Sensitivity of *Botrytis cinerea* From Nectarine/Cherry in China to Six Fungicides and Characterization of Resistant Isolates. *Plant Disease* 102:2578–2585.

Yohalem, D., K. Nielsen, and M. Nicolaisen. 2003. Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxonomy* 85:175–182.

Zhan, J., and B. A. McDonald. 2013. Experimental Measures of Pathogen Competition and Relative Fitness. *Annual Review of Phytopathology* 51:131–153.

