

**Développement d'une méthode de détection pour la brûlure stemphylienne
dans la culture de l'oignon**

PHYD-1-17-1841

AVRIL 2018-MARS 2021

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Hervé Van der Heyden (Phytodata)

Mars 2021

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

Développement d'une méthode de détection pour la brûlure stemphylienne dans la culture de l'oignon

PHYD-1-17-1841

RÉSUMÉ

La culture de l'oignon est assujettie à de nombreuses maladies à dispersion aérienne, incluant la brûlure de la feuille, le mildiou de l'oignon et la brûlure stemphylienne. Au Québec, la brûlure stemphylienne de l'oignon a été observée sporadiquement depuis 2005 et progresse rapidement, jusqu'à nécessiter maintenant l'utilisation annuelle de fongicides spécifiques. *Stemphylium vesicarium*, l'agent responsable de la brûlure stemphylienne, infecte généralement les tissus sénescents comme les pointes des feuilles jaunies et les lésions causées par le mildiou ou l'alternariose. Toutefois, lorsque les températures moyennes sont supérieures à 18°C, que l'humidité relative est supérieure à 70% et que l'oignon est en situation de stress, l'infection des tissus sains est favorisée. Les changements climatiques et l'augmentation des températures moyennes risquent de favoriser les infections causées par *S. vesicarium*, augmenter la récurrence des épidémies et par conséquent le nombre d'applications de fongicides. L'augmentation de la fréquence des épidémies de brûlure stemphylienne risque de compromettre les efforts réalisés dans l'oignon en ce qui a trait à la réduction de l'utilisation des fongicides. Ce projet a été réalisé entre 2018 et 2020. À chaque année, 10 champs d'oignons secs ont été suivis du début juin à la récolte. Dans chaque champs, 25 parcelles aléatoires et 3 parcelles fixes ont été suivies, pour un total de 10 244 observations. Des données d'incidence et de sévérité ont été prises tout au long de la saison à deux niveaux hiérarchiques. Dans chacun de ces champs, un capteur de spores était également installé et l'inoculum aérien a été mesuré trois fois par semaine. Ces résultats ont tout d'abord servi à développer une courbe d'échantillonnage. De plus, à l'aide de ces données, un modèle d'estimation des risques a été évalué. Ce dernier semble bien performer avec une relation significative entre les prévisions de risques et l'incidence de la maladie. Les concentrations aériennes de spores représentent également un bon indicateur de risques. Enfin, un marqueur moléculaire a été développé.

INTRODUCTION

Stemphylium vesicarium est un organisme pathogène polyphage qui s'attaque à différentes cultures incluant la lentille, la poire, l'ail, le poireau et l'oignon (Farr et Rossman, 2017). Sur l'oignon, les symptômes sont caractérisés par des lésions oblongues à ovales, jusqu'à 7cm de longueur principalement sur les pointes et le centre des feuilles matures (Misawa et Yasuoka, 2012). *S. vesicarium* infecte toutes les parties aériennes de la plante et la taille des bulbes des plants fortement atteints est considérablement réduite. En effet, les pertes associées à cet agent pathogène dans l'oignon peuvent être très élevées, pouvant atteindre plus de 90% de pertes de rendement (Lorbeer, 1993).

Le cycle biologique de *S. vesicarium* est caractérisé par deux phases : sexuée et asexuée. Les pseudothèces produits au cours de la phase sexuée du cycle sont généralement retrouvés sur des débris de culture et sur les inflorescences (Misawa et Yasuoka, 2012 ; Rossi et al, 2008). Le développement de ces pseudothèces survient à des températures comprises entre 5 et 15°C et lorsque l'humidité relative est élevée. C'est à l'intérieur de ces structures que les ascospores, la source d'inoculum initial, mûriront pendant une période variant de 1 à 6 mois (Simmons, 1985). Les premières ascospores sont généralement relâchées au printemps lors de pluies. Ces ascospores d'une taille d'environ 18 x 38µm, sont jaunâtre à brun pâle et comptent de 5 à 7

septa transversaux complets, ainsi qu'une quantité variable de septa incomplets (Simmons, 1985). Ces ascospores sont capables d'infecter les parties aériennes de l'oignon, mais leur rôle véritable dans l'épidémiologie de la brûlure stemphylienne de l'oignon est à définir (Prados-Ligero et al. 1998). Pour l'oignon et les autres Alliums, les infections au champ sont généralement causées par l'inoculum secondaire, soit les conidies transportées par le vent (Misawa et Yasuoka, 2012 ; Prados-Ligero et al. 1998). Ces conidies sont brunes plutôt foncées et comptent de 1 à 5 septa latéraux complets et 1 à 2 septa longitudinaux (Simmons, 1985). Ces conidies sont généralement d'une taille variant de 12-22µm par 25-42µm avec une cicatrice d'abscision à la base d'au plus 7µm.

Les patrons de distribution des concentrations aériennes d'ascospores et de conidies ont été décrits pour l'ail en Espagne (Prados-Ligero et al. 1998). Ces travaux ont démontré que la distribution des ascospores était erratique, avec une proportion d'à peine 30% des captures entre minuit et 6h. Toutefois, les concentrations quotidiennes de conidies étaient capturées principalement entre 12h et 18h avec un pic significatif vers 14h (Prados-Ligero et al. 1998). Des travaux similaires ont également été réalisés en Ontario dans la culture de l'oignon et supportent eux aussi le potentiel d'utilisation de l'inoculum aérien de *S. vesicarium* pour le suivi de la maladie (Tayviah, 2017). Sous ces conditions environnementales, plus proches de celles rencontrées au Québec, les conidies étaient capturées principalement entre 8 et 14h (Tayviah, 2017). Les concentrations aériennes de spores étaient significativement corrélées avec le nombre de jours ayant une température moyenne supérieure à 15 °C (Gossen et al. 2021).

En général, *S. vesicarium* infecte son hôte par les stomates ouverts, les blessures et les tissus affectés par des stress ou par d'autres maladies comme le mildiou, et les vieilles feuilles d'oignon sont plus susceptibles que les jeunes feuilles. Une fois déposées sur le feuillage, la germination des conidies peut survenir à des températures comprises entre 5 et 35 °C avec des températures optimales supérieures à 18 °C et une durée de mouillure supérieure à 6h (Shishkoff et Lorbeer, 1989). Les symptômes apparaissent après une période d'incubation variant de 6 à 14 jours. En Ontario, le modèle prévisionnel BOTCAST (développé pour *B. squamosa*) est préconisé pour prédire les risques de sporulation de *S. vesicarium* et ce dernier semble permettre de diminuer l'incidence de la maladie.

Au Québec, les régies fongicides sont généralement orientées vers un contrôle de la brûlure de la feuille (*Botrytis squamosa*) et du mildiou (*Peronospora destructor*), et on assume généralement que ces régies contrôleront également la brûlure stemphylienne. Jusqu'à tout récemment, la brûlure stemphylienne apparaissait sporadiquement, mais avec les changements climatiques, cette maladie semble être de plus en plus fréquente. Certaines années, elle nécessite même l'utilisation de fongicides spécifiques. Toutefois, nous ne disposons pas d'outils d'aide à la décision adaptés (dépistage, modèles prévisionnels, etc.) et il n'existe conséquemment aucun seuil d'intervention spécifique.

L'objectif de ce projet consistait à mettre au point une méthode d'estimation des risques pour la brûlure stemphylienne de l'oignon. Plus précisément, il s'agissait de :

- 1) Caractériser la relation incidence-sévérité, déterminer la structure spatiale de l'incidence de la brûlure stemphylienne et proposer une courbe d'échantillonnage (dépistage);
- 2) Vérifier la relation entre l'incidence et les indicateurs de risques (modèle et spores);
- 3) Adapter un marqueur moléculaire permettant de quantifier cet agent pathogène à partir d'échantillons aériens.

MÉTHODOLOGIE

Sites d'échantillonnage. Pour ce projet, 30 champs appartenant à 14 producteurs d'oignon ont été échantillonnés entre 2018 et 2020. Les champs étaient principalement situés dans les terres noires de la MRC des Jardins-de-Napierville. Chacun des champs a été suivi du début juin jusqu'au stade BBCH 47 ou lorsque 10% des feuilles étaient sénescentes. Pour éviter d'introduire un biais associé au cultivar, tous les sites étaient implantés dans des cultivars jugés similaires (même durée de croissance, sensibilité selon le semencier, etc.) Le stade de l'oignon a été consigné à chaque visite. Les évaluations ont été réalisées de façon hebdomadaire, à jour fixe. L'acquisition des données météorologiques s'est faite par le biais d'un abonnement à l'API Wunderground PWS (station météorologique personnelle, un abonnement de 275\$/mois). En plus de notre propre PWS, également disponible pour tous les utilisateurs de Wunderground, nous avons accès à toutes les PWS disponibles dans le programme. Pour récupérer les données de la base de données Wunderground, nous avons utilisé un script Python personnalisé, développé par notre équipe.

Évaluation de la maladie. Dans chaque champ, les oignons ont tout d'abord été échantillonnés sur 25 sites (un plant par site) répartis de façon aléatoire le long d'un transect en forme de W (annexe 1). Dans chaque champ, trois sites fixes ont également été implantés lors de la première visite et suivis à chacune des visites subséquentes. Pour les sites fixes, 10 oignons étaient observés sur un mètre de rang. Lors de chaque évaluation, le nombre de feuilles vertes était noté, ainsi que le nombre de feuilles atteintes par la maladie. L'incidence était définie au niveau du nombre de feuilles atteintes sur le nombre de feuilles vertes (IncF), et également au niveau du nombre de plants atteints sur le nombre de plants observés (un plant étant considéré comme étant atteint lorsqu'au moins une feuille était atteinte) (IncP). Ces mesures (toutes deux sur une échelle de 0 à 1) représentaient donc deux niveaux hiérarchiques différents : IncP était l'intensité de la maladie au niveau du champ et IncF était l'intensité de la maladie au niveau du plant. La sévérité a également été évalué et correspondait au pourcentage de surface foliaire atteinte (SEV).

Relation incidence-sévérité. La relation entre l'incidence et la sévérité (*I-S*) à différents niveaux hiérarchiques permet de prédire l'incidence ou la sévérité à un niveau hiérarchique inférieur, à l'aide d'observations recueillies à des niveaux hiérarchiques supérieurs, souvent plus faciles à prendre (McRoberts et al. 2003; Spolti et al. 2015; Carisse et al. 2012). Cette analyse est donc utile pour le développement et l'adaptation de méthodes de dépistage. Le pourcentage de feuilles atteintes, le pourcentage de plants atteints et le pourcentage de surface foliaire atteinte ont été utilisés pour cette analyse. Le modèle logarithmique complémentaire suivant a été ajusté aux données :

$$CLL(S) = \alpha + \beta (CCL(I))$$

où α et β sont l'ordonnée à l'origine et la pente de la régression et $CLL(\bullet)$ est donné par l'équation suivante : $\ln [-\ln(1-(\bullet))]$. Les analyses ont été réalisées sur les données obtenues avec les sites fixes et les données obtenues des sites aléatoires.

Analyse spatiale et courbe d'échantillonnage. La connaissance des patrons de distribution spatiale est très importante pour l'élaboration des plans d'échantillonnage et par conséquent, les protocoles de dépistage. Afin de mesurer la tendance qu'a la maladie à apparaître en foyers, l'indice de dispersion D a été utilisé (Madden et al. 2017). La version binomiale de l'indice de dispersion D adaptée aux données d'incidence est donnée par la formule suivante :

$$D_{bin} = \sigma^2 / \sigma_{bin}^2,$$

où σ^2 et σ_{bin}^2 sont la variance observée et la variance binomiale ($y(1-y)n$), respectivement. Des valeurs de $D_{bin} > 1$ suggèrent la sur-dispersion alors qu'une valeur de $D_{bin} < 1$ indique la sous-dispersion (hétérogénéité). Dans le cas où $D_{bin} = 1$, la dispersion est considérée comme étant homogène. L'hétérogénéité spatiale a également été caractérisée à l'aide d'une version binaire de la fonction de Taylor, la loi de puissance binomiale. Cette fonction résume empiriquement la relation entre la variance observée (σ^2) et la variance binomiale (σ_{bin}^2) selon l'équation suivante :

$$\log(\sigma^2) = \log A + b \log(\sigma_{bin}^2)$$

À partir des paramètres de l'équation de puissance binomiale, une courbe d'échantillonnage a été calculée pour différents coefficients de variation.

$$N = (\hat{A}\bar{y}^{\hat{b}-2}) * (1 - \hat{y})^{\hat{b}} / (n^{\hat{b}} CV^2)$$

où \hat{A} et \hat{b} sont les valeurs estimées de la loi de puissance binomiale. Le coefficient CV est fixé, et correspond au pourcentage d'erreur que l'utilisateur est prêt à accepter.

Mesure de l'inoculum aérien. Dans chacun des sites d'échantillonnage était installé un capteur de spores à impaction. Les capteurs de spores étaient en opération trois fois par semaine de 8h à 14h et pendant cette période échantillonnaient 50% du temps, à intervalles de 10 minutes. Le comptage des spores a été fait en microscopie, à un grossissement de 250X.

Valider un modèle de prédiction des risques. Cet objectif consistait à déterminer si un des modèles disponibles dans la littérature pouvait être utilisé dans le cadre d'un suivi des risques de développement de la brûlure stemphylienne. Les deux modèles prévisionnels retenus pour l'évaluation étaient BOTCAST (Sutton et al. 1986) et le model LDSI (Mwakutuya et al. 2010).

Développement d'un marqueur moléculaire. Cet objectif consistait à développer un marqueur moléculaire permettant la détection de *S. vesicarium*. Lors des évaluations hebdomadaires, des sections de feuilles présentant des symptômes typiques étaient prélevées et rapportées au laboratoire. Les sections de feuilles symptomatiques ont ensuite été isolées sur milieu PDA-novo. L'identification au genre a été faite à l'aide de critères morphologiques et l'identification à l'espèce a été faite par séquençage (région ITS et *gdp*). Par la suite, les séquences des souches de *Stemphylium sp.* obtenues dans le cadre du projet ont été alignées avec des séquences retrouvées dans les banques de données publiques (i.e. GeneBank). À l'aide de cet alignement, une première évaluation théorique de la spécificité a été effectuée. La spécificité du système a ensuite été évaluée physiquement à l'aide d'ADN génomique d'espèces proches et d'espèces retrouvées dans l'environnement, à une concentration de 1ng/ul. Plusieurs démarches ont été tentées pour obtenir des souches ou de l'ADN de d'autres espèces de *Stemphylium*, mais la disponibilité des souches était très limitée, que ce soit au LEDP, à la collection Canadienne ou chez ATCC. Pour contourner cette difficulté, de l'ADN synthétique (gBlock, IDT) a été utilisé. La sensibilité du système a été évaluée à l'aide de courbes standards réalisées en ADNg et en amplicons.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Les trois années du projet étaient très différentes tant au point de vue météorologique (Tableau 1) qu'au niveau de l'incidence et la sévérité de la maladie (Figure 1). Les saisons 2018 et 2020 ont été plus chaudes en moyenne que la saison 2019 et le nombre de jours où la température

dépassait les 26°C était également plus élevé. Des températures supérieures à 26°C peuvent induire un stress chez l'oignon, et favoriser le développement de la maladie (Wright et al. 2019). Au niveau des précipitation, la saison 2018 a enregistré de plus importantes précipitations, mais un nombre de jours de pluie équivalent aux deux autres années. Les quantités de pluie tombées par événement étaient plus importantes en 2018, ce qui peut également induire un stress pour la plante.

Tableau 1: Résumé des conditions météo pour les trois années du projet (les moyennes mensuelles sont présentées à l'annexe 2).

Année	Température moyenne (°C)	Nombre de jour où $T_{moy} > 26^{\circ}\text{C}$	Nombre de jour où la température atteint 26°C	Pluviométrie (accumulation totale mm)	Nombre de jours de pluie	Humidité relative moyenne (%)
2018	19.9	5	8	284	21	69
2019	18.6	2	4	235	22	72
2020	19.9	3	9	232	20	69

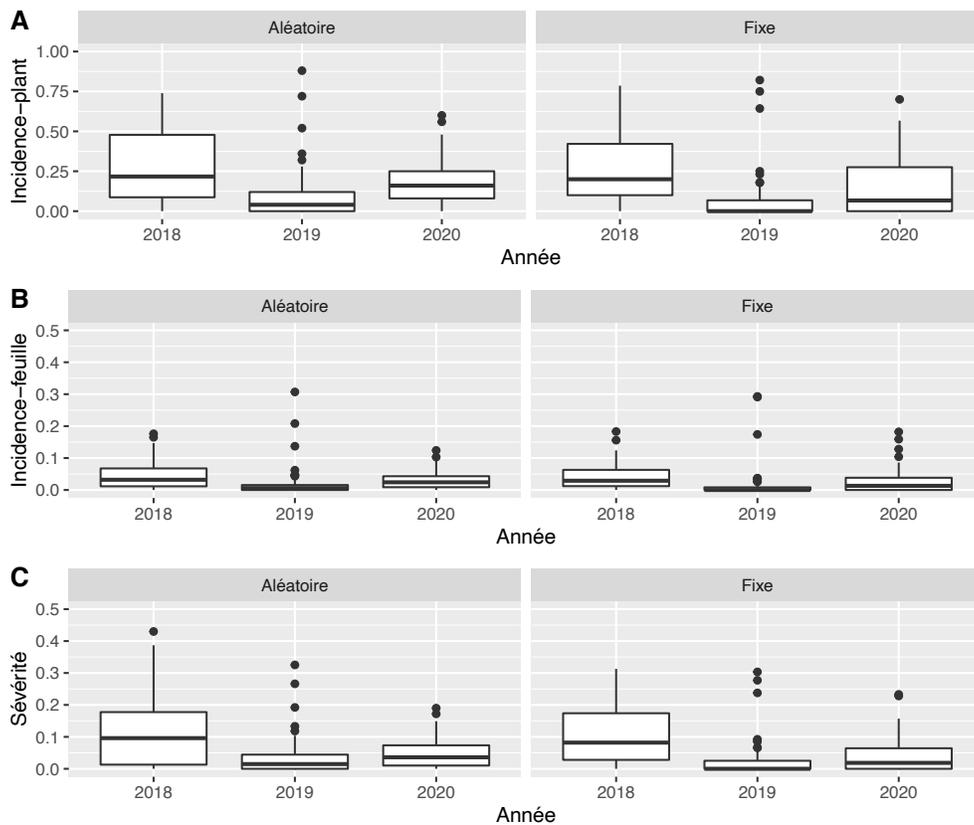


Figure 1: Résumé des données d'incidence-plant (A), d'incidence-feuille (B) et de sévérité (C) pour les trois années du projet. Les données sont présentées individuellement pour les sites fixes et aléatoires.

Au total, 10 244 observations ont été recueillies pour chacun des paramètres mesurés dans le cadre de ce projet. Pour l'incidence-plant, la moyenne observée des sites fixes et aléatoires était de 27%, 8% et 16% pour 2018, 2019 et 2020, respectivement (Figure 1A). Pour l'incidence-feuille, la moyenne était de 4%, 2% et 3% pour 2018, 2019 et 2020,

respectivement (Figure 1B). Enfin, pour la sévérité, la moyenne était de 11%, 3% et 5% pour 2018, 2019 et 2020, respectivement (Figure 1C).

Relation incidence-sévérité.

À l'aide de ces observations, la relation incidence-sévérité a été étudiée à deux niveaux hiérarchiques. L'objectif était de déterminer si l'incidence-plant suffisait pour estimer l'incidence-feuille ou la sévérité, puisque cette valeur est facile à prendre, et ne demande que peu d'effort d'échantillonnage. Les pentes et ordonnées à l'origine des modèles ajustés avec les jeux de données fixes et aléatoires ont été comparées afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les paramètres des méthodes d'échantillonnage. Comme il n'y avait pas de différence significative entre les méthodes d'échantillonnage (fixes ou aléatoires), les données ont été regroupées pour être analysées (Figure 2). Les versions ajustées de l'équation CLL et les valeurs de R^2 associées pour chaque niveau hiérarchique étaient :

$$CLL(IF) = -2.10 + 0.95(CCL(IP)); (R^2 = 0.93)$$

$$CLL(IF) = -1.27 + 1.1 (CCL(IP)); (R^2 = 0.70)$$

$$CLL(IF) = -0.55 + 0.98 (CCL(IP)); (R^2 = 0.54)$$

Les coefficients de corrélation de Pearson pour l'ajustement des données observées sur les données ajustées étaient de 0.98, 0.85 et 0.73 pour les trois équations respectivement ($P < 0.001$). Les résultats obtenus ici suggèrent que l'incidence-plant peut être un très bon indicateur de l'incidence-feuille et de la sévérité.

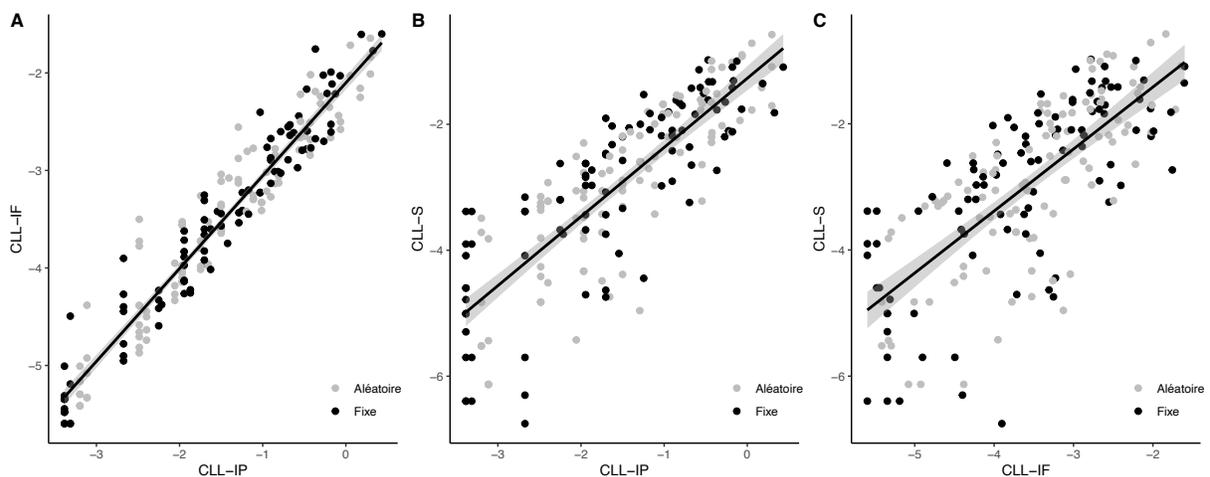


Figure 2: Relation incidence-sévérité pour les trois types de données recueillies dans le cadre de ce projet : l'incidence plant (IP), l'incidence-feuille (IF) et la sévérité (S). Les points gris représentent les données recueillies dans les sites aléatoires et les points noirs les données provenant des sites fixes.

Courbes d'échantillonnage.

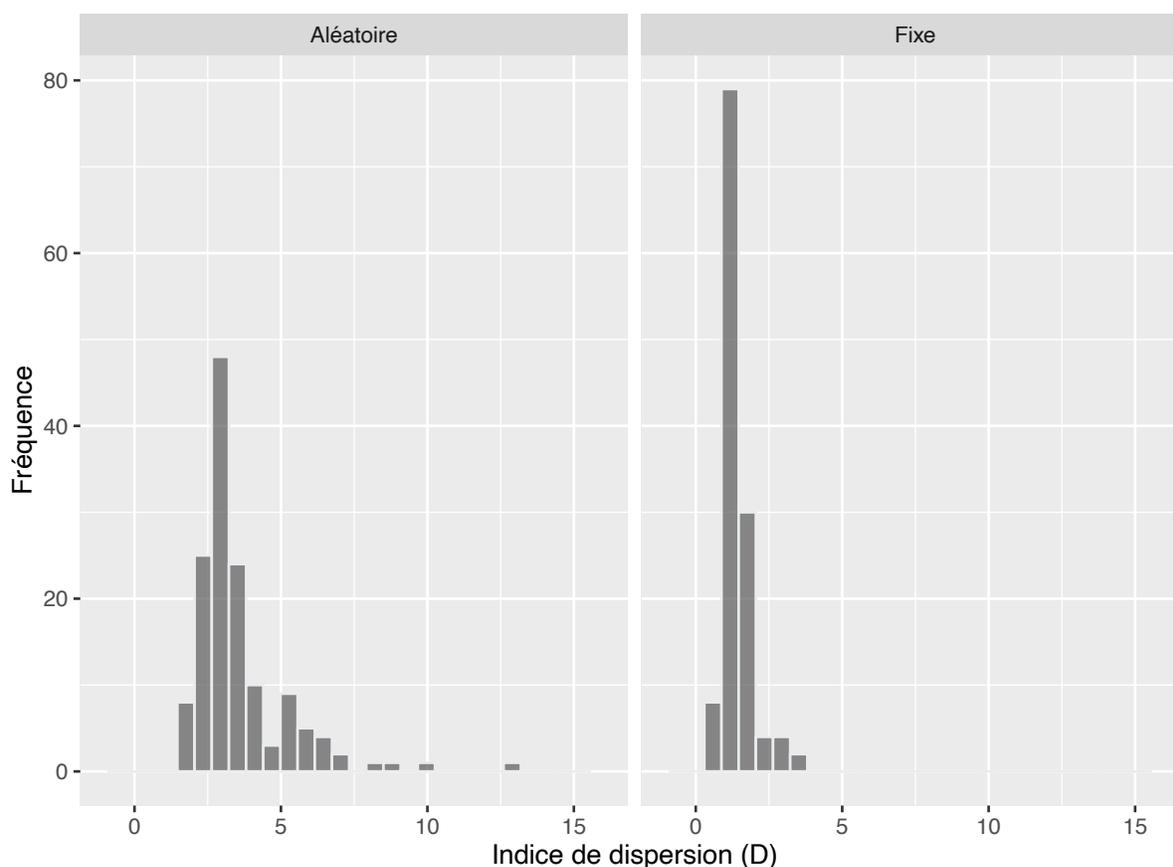


Figure 3: Distribution des valeurs de l'indice de dispersion D pour les données obtenues des sites aléatoires et fixes.

Comme l'incidence-plant permet d'estimer l'incidence-feuille et la sévérité, les analyses de distribution spatiale ont été effectuées avec ce paramètre. Pour la variation intra-groupe, la valeur de l'indice de dispersion D était plus grande pour les parcelles aléatoires ($D_{\text{moy}}= 3.6$) que pour les parcelles fixes ($D_{\text{moy}}= 1.4$) (Figure 3). Tel qu'attendu, les résultats suggèrent une distribution plus hétérogène à l'échelle du champ, qu'à l'échelle de la parcelle. Similairement, on observe un effet significatif du type d'échantillonnage sur l'ordonnée à l'origine de la régression de Taylor ($P<0.0001$), mais pas pour les pentes (1.06 et 1.05 pour les sites fixes et aléatoire, respectivement) (Figure 4). À l'échelle du champ, cette variabilité est moins flagrante et la distribution se rapproche d'une distribution homogène.

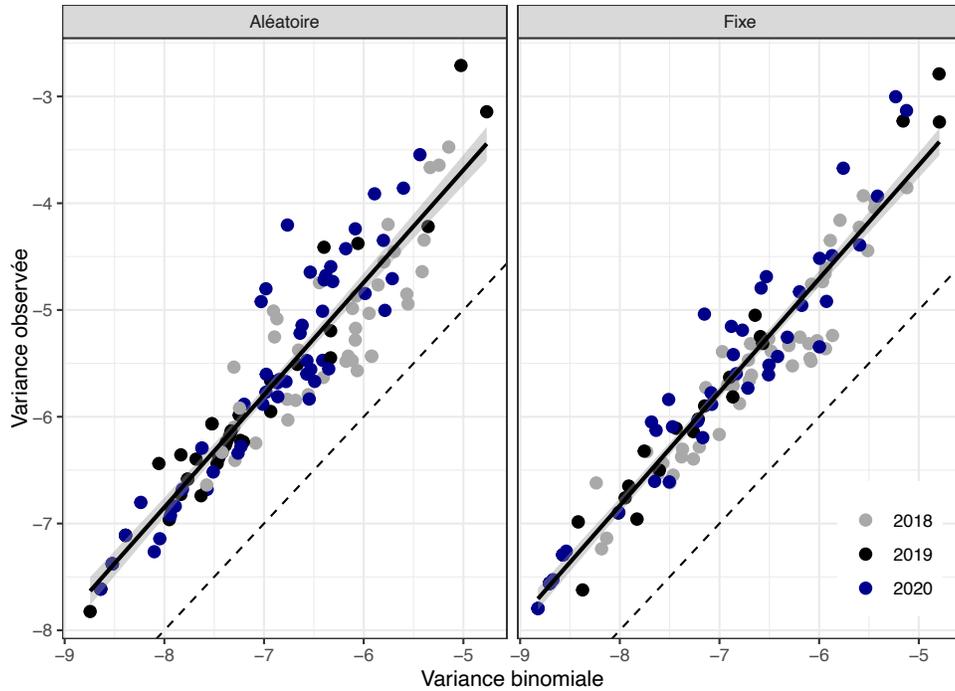


Figure 4: Relation entre la variance observée et la variance binomiale pour l'incidence de la brûlure stemphylienne avec les données obtenues des sites aléatoires et fixes.

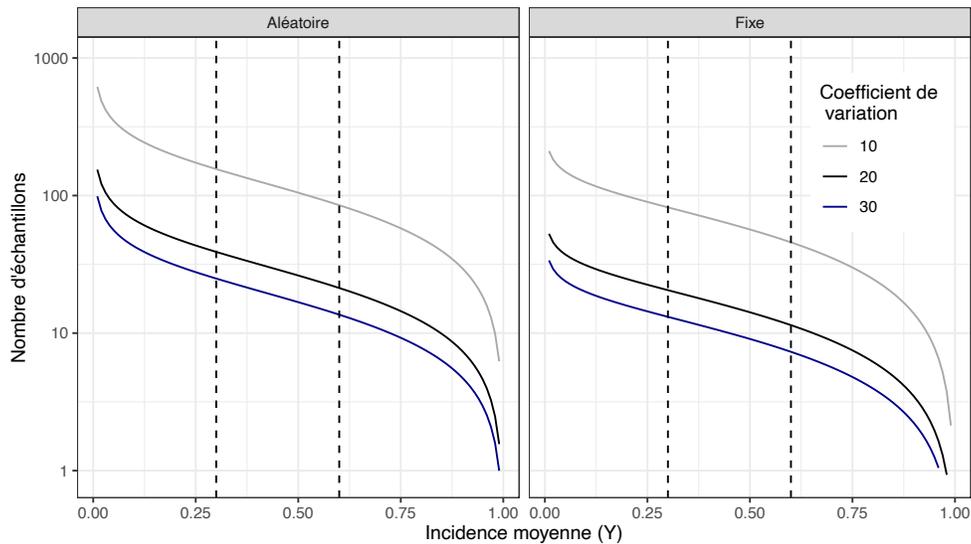


Figure 5. Courbes d'échantillonnage proposées pour l'estimation de l'incidence de la brûlure stemphylienne, selon un parcours aléatoire ou fixe et un coefficient de variation (CV) de 10%, 20% ou 30%.

À partir des paramètres obtenus de l'équation pour la loi de puissance binomiale, une courbe d'échantillonnage a été calculée pour trois valeurs de coefficient de variation (10%, 20% et 30%), pour les sites aléatoires et fixes (Figure 5). Le coefficient de variation peut être vu comme étant le pourcentage d'erreur que l'utilisateur est prêt à accepter. Ces courbes fournissent le nombre d'échantillons nécessaires pour estimer une incidence moyenne prédéterminée. Elles seront très utiles lorsque des seuils d'intervention précis seront

déterminés. Par exemple, pour un seuil d'intervention situé entre 40% d'incidence avec 20% d'erreur, il faudra faire un minimum de 30 échantillons pour un parcours aléatoire et 17 échantillons pour un parcours fixe.

Modèles prévisionnels.

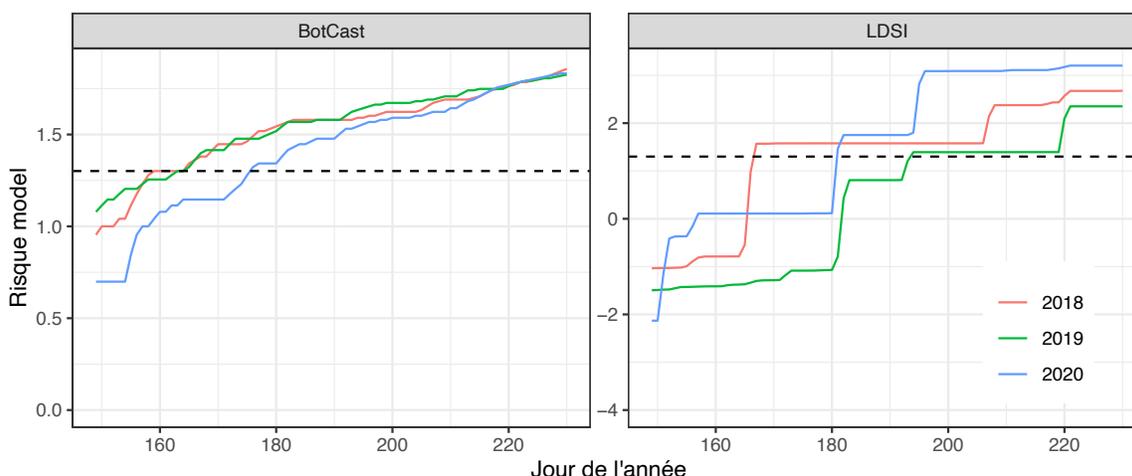


Figure 6. Risques de développement de la brûlure stemphylienne estimés par les deux modèles prévisionnels à l'essai. La ligne pointillée correspond au seuil d'initiation de la régie de traitements.

Les deux modèles retenus pour l'évaluation (BOTCAST et LDSI) fournissaient des résultats forts différents. Tout d'abord, le modèle BOTCAST donnait des courbes de risques similaires pour les saisons 2018 et 2019, alors que l'incidence et la sévérité de la maladie étaient beaucoup plus basses en 2019 qu'en 2018 (Figure 1). Selon ce modèle, le seuil d'initiation des régies aurait été atteint à la mi-juin pour ces deux saisons, alors qu'elle aurait été initiée à la fin juin pour la saison 2020 (Figure 6). Le modèle LDSI quant à lui recommandait d'initier les régies le 17 juin, 14 juillet et 1 juillet respectivement pour 2018, 2019 et 2020, ce qui reflétait plus fidèlement les observations des symptômes au champ.

Le modèle LDSI est basé sur l'équation suivante :

$$\text{LDSI} = -4.7547 + 0.003096T + 0.0708W + 0.004307TW$$

où T est la température moyenne et W la durée de mouillure dans les dernières 24h. La relation entre l'indice de risque et l'incidence 10 jours plus tard suit une relation quadratique significative ($R^2 = 0.64$, $P < 0.0001$) (Figure 7). Le coefficient de corrélation de Pearson pour l'ajustement des données observées sur les données ajustées était de 0.803 et significatif ($P < 0.0001$). Selon cette courbe, les symptômes restent en dessous de 10% d'incidence jusqu'à un indice LDSI de 60, valeur à partir de laquelle l'incidence augmente rapidement (Figure 7). Cette valeur pourrait donc constituer un seuil d'intervention à tester.

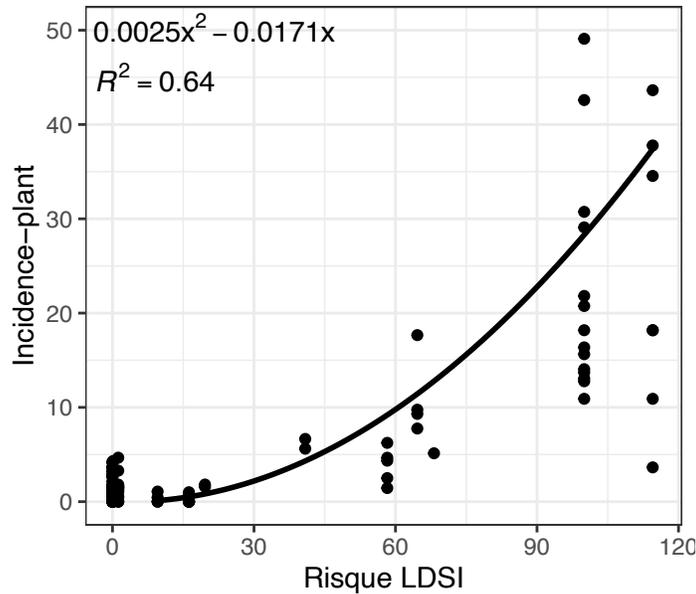


Figure 7. Relation entre les risques de développement de la brûlure stemphylienne prédits par le modèle LDSI et le développement de la maladie au champ.

Concentrations aériennes de spores.

Les concentrations moyennes de spores observées étaient cohérentes avec l'incidence de la maladie (Figure 8A-B). En 2018, les premières spores ont été captées le 26 juin et les quantités sont restées faibles en moyenne jusqu'au 26 juillet (jour 206 du calendrier) (Figure 8A). Après cette date, les concentrations de spores ont augmenté de façon exponentielle jusqu'à atteindre 388 spores/m³ d'air le 5 août 2018. En 2019, les concentrations de spores étaient beaucoup plus faibles. Les premières spores ont été captées le 30 juin, et les quantités sont restées faibles en moyenne jusqu'au 30 juillet (jour 210 du calendrier) (Figure 8A). Après cette date, les concentrations de spores ont augmenté lentement jusqu'à atteindre 250 spores/m³ d'air le 15 août 2019. Pour 2020, les concentrations de spores étaient plus faibles qu'en 2018, mais les captures plus fréquentes. Les premières spores ont été captées le 9 juin, mais les quantités sont restées faibles en moyenne jusqu'au 2 août (jour 214 du calendrier) (Figure 8A). Après cette date, les concentrations de spores ont augmenté lentement jusqu'à atteindre 148 spores/m³ d'air le 18 août 2020. Dans l'ensemble, l'incidence était bien fortement corrélée avec les concentrations de spores avec une semaine de décalage. Toutefois, c'est avec l'incidence-feuille que la corrélation était la plus forte ($r = 0.77$, $P < 0.0001$). Ces résultats suggèrent que les concentrations de spores peuvent également être un bon indicateur de risque de développement de la maladie.

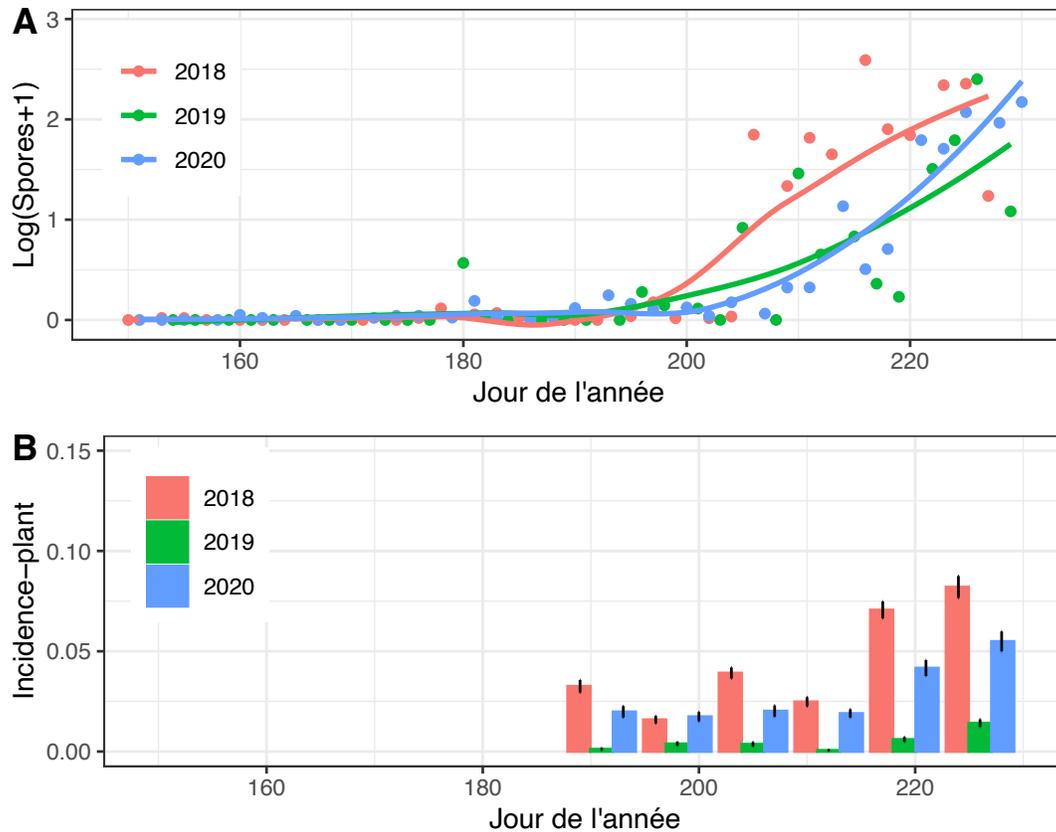


Figure 8. Concentration aérienne de spores moyenne pour les trois années du projet (A) et l'incidence-plant moyenne pour les trois années du projet (B).

Marqueur moléculaire.

Un peu plus de 300 souches appartenant à différentes espèces retrouvées à la surface des feuilles d'oignon atteintes (notamment, *Fusarium* spp., *Epicoccum* sp., *Alternaria* spp. *Peyronellae* sp., *Botrytis* spp., *Peronospora destructor* et *Stemphylium vesicarium*) ont été isolées. En plus de ces espèces, quelques espèces proches (i.e. *S. botryosum* et *S. beticola*) ont également été obtenues de d'autres cultures (ex. épinards). Un premier séquençage a été fait de la région ITS, mais cette dernière ne permet pas d'identifier *Stemphylium* à l'espèce. En plus de la région ITS, un séquençage a également été réalisé pour le glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gdp*) et calmoduline (*cmd*). De nombreux modèles d'amorces et de sondes ont été conçus, mais seule une région située sur le gène *gdp* permettait une discrimination à l'espèce, pour la majorité des espèces séquençées (Figure 9).

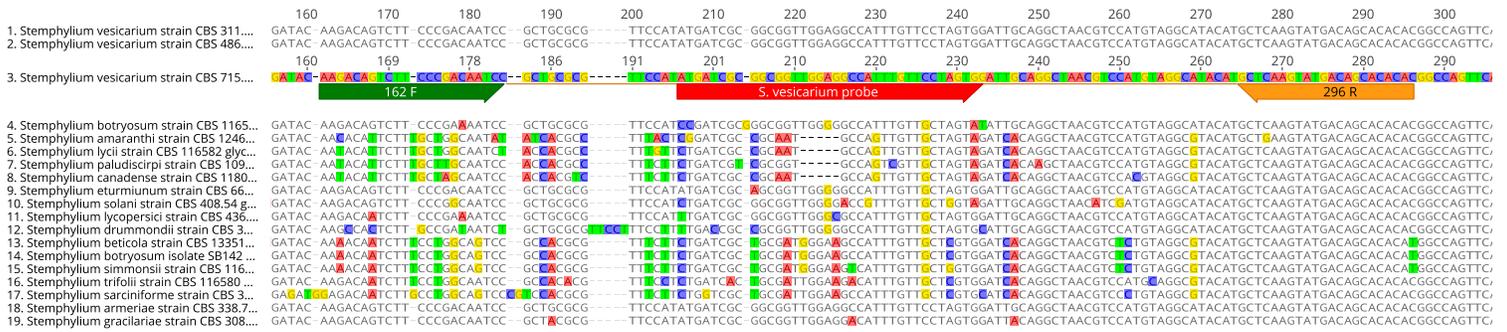


Figure 9: Alignement des séquences gdp et positions des amorces et sondes utilisées pour *S. vesicarium*.

Comme il était difficile d’obtenir des souches de ces autres espèces, même à travers le LEDP ou la banque de souches ATCC, des fragments d’ADN synthétique de 750pb ont été utilisés pour la validation. Cette approche de remplacement n’est pas idéale, puisqu’elle ne tient pas compte de toute la variation génétique et, même purifiée, ces fragments d’ADN synthétiques sont de longueurs diverses, et peuvent donner des faux positifs si la séquence du fragment est tronquée du côté des amorces.

Tableau 2. Résultats des tests de spécificité.

Souches Testées	Source	Gène	Concentration	Amplification (Cq)
<i>Stemphylium vesicarium</i>	LEDP	GAPDH	3 ng	21.07
<i>S. vesicarium</i>	oignon	GAPDH	3 ng	24.95
<i>S. vesicarium</i>	oignon	GAPDH	3 ng	24.14
<i>S. vesicarium</i>	oignon	GAPDH	3 ng	20.53
<i>S. vesicarium</i>	oignon	GAPDH	3 ng	19.99
<i>S. vesicarium</i>	LEDP	GAPDH	3 ng	20.39
<i>S. amaranthi</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. armeriae</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	25.20
<i>S. beticola</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. botryosum</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	30.10
<i>S. drummondii</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. eturmiunum</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	28.20
<i>S. gracilariae</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	27.25
<i>S. lycii</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. lycopersici</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. paludiscirpi</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. sarciniforme</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. simmonsii</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. solani</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. trifolii</i>	gBlock	GAPDH	600 copies	.
<i>S. beticola</i>	LEDP	GAPDH	3 ng	.
<i>S. beticola</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>Trichoderma sp.</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>Alternaria sp.</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>Botrytis alli</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>B. squamosa</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>B. squamosa</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>Fusarium oxysporum fsp. cepae</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>F. oxysporum fsp. cepae</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.
<i>F. oxysporum fsp. cepae</i>	oignon	GAPDH	3 ng	.

Toutes les souches de *S. vesicarium* testées étaient positives avec le marqueur développé dans le cadre du projet et toutes les espèces n'appartenant pas au genre *Stemphylium* étaient négatives. Toutefois, quatre espèces proches de *S. vesicarium* donnaient un signal positif (Tableau 2). À part pour *S. botryosum*, les trois autres espèces étaient considérées comme étant des *S. vesicarium* avant que la nomenclature n'ait été revisitée en 2017 (Woudenberg et al. 2017). Compte tenu des différences entre les séquences de *S. botryosum* et *S. vesicarium*, il est envisageable d'améliorer la spécificité du test. L'efficacité d'amplification était linéaire pour une large gamme de concentrations ($R^2 = 0.99$ pour les courbes standard en amplicons et en ADNg) (Figure 10). La limite de détection du test est de 6 copies du gène *gdp* par réaction de qPCR.

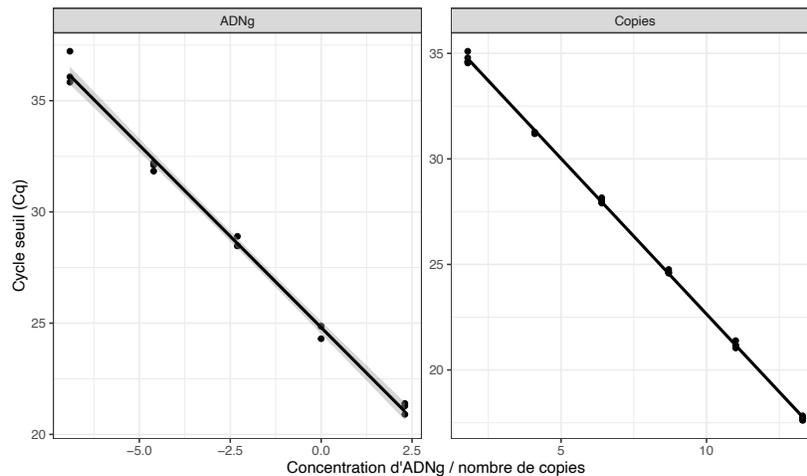


Figure 10 : Efficacité de la réaction de qPCR pour une courbe standard en ADN génomique et en nombre de copies du gène *gdp*.

DIFFUSION DES RÉSULTATS

Tout au long du projet, les résultats des comptages de spores étaient transmis aux producteurs participants ainsi qu'à leurs conseillers. Les modèles prévisionnels sont disponibles en version Excel, simples à utiliser, pour ceux qui souhaitent intégrer ces résultats à leurs pratiques. Les résultats partiels et les résultats finaux de ce projet ont été présentés aux producteurs d'oignons de la Montérégie Ouest, à travers les rencontres annuelles de PRISME et lors de l'AGA des producteurs d'oignons du Québec et le thème sera proposé aux organisateurs de la prochaine édition des Journées Horticoles. La fiche de transfert sera déposée sur les sites WEB d'Agri-réseau, de PRISME et du PELI. La partie visant la relation incidence-sévérité et la distribution spatiale fera l'objet d'une soumission à une revue scientifique appropriée.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE

En Ontario ainsi que dans l'état de New-York, la brûlure stemphylienne, causée par *Stemphylium vesicarium*, préoccupe de plus en plus les producteurs d'oignon. Cette maladie était généralement considérée comme étant une maladie secondaire, s'attaquant principalement aux plantes qui subissent un stress hydrique ou de chaleur. Or, à cause des changements climatiques, le nombre de jours où la plante est assujettie à ce genre de stress augmente d'une année à l'autre. Cette maladie n'est pas encore très préoccupante pour les producteurs d'oignon du Québec, mais compte tenu de sa progression dans les régions productrices voisines, on

s'attend à ce qu'elle gagne en importance au Québec, surtout au sud de Montréal. Toutefois, nous ne disposons pas d'outils d'aide à la décision spécifiquement adaptés à cette maladie.

Toute stratégie intégrée de gestion en agriculture repose sur l'utilisation de différentes approches comme le dépistage, la désinfection des outils de travail du sol, le choix de cultivars tolérants ainsi que l'utilisation de modèles prévisionnels. Dans le cadre de ce projet, nous avons travaillé sur trois aspects importants, à la base des stratégies de lutte aux agents pathogènes aérotransportés : le dépistage, les modèles prévisionnels et les concentrations de spores. Les courbes d'échantillonnage pourront être facilement transférées aux utilisateurs, ce qui permettrait d'uniformiser les techniques de dépistage utilisées sur le territoire. De plus, bien qu'il soit nécessaire de valider les seuils d'intervention, nos résultats suggèrent que le modèle d'estimation des risques basé sur l'équation de Mwakutuya serait un bon indicateur de risque ($r = 0.8$). Similairement, les concentrations de spores étaient fortement corrélées ($r = 0.8$) avec l'incidence, est ce avec une semaine de décalage, ce qui confirme également son utilité prédictive. L'utilisation des capteurs de spore comme outils d'aide à la décision a fait ses preuves dans de nombreux contextes et s'avère être également un bon indicateur de risque pour la brûlure stemphylienne. À court terme, les capteurs de spores pourraient être utilisés dans un cadre de surveillance pour 1) détecter les premières spores de *S. vesicarium* et 2) de suivre les fluctuations dans les concentrations de spores. Ces usages pourraient permettre aux usagers de dériver des stratégies d'utilisation basées sur l'observation. De plus, malgré la difficulté d'obtenir des souches de références, un marqueur moléculaire a été développé dans le cadre de ce projet. Bien que du travail d'optimisation soit nécessaire, cet outil pourra servir au suivi et au diagnostic.

Ce projet constituait une première étape dans l'élaboration d'une stratégie de gestion de la brûlure stemphylienne de l'oignon,

- Des seuils d'intervention formels, basés sur les indicateurs de risques développés ici devront être évalués ultérieurement. La prochaine étape devrait être de tester des seuils d'intervention, basés sur les comptages de spores, les risques météo ou une combinaison des deux.
- Il serait intéressant de se doter d'une classification en ce qui concerne la sensibilité des cultivars d'oignon à la brûlure stemphylienne. En effet, cette information devrait faire partie d'une stratégie de gestion intégrée.
- Par ailleurs, il a été démontré que *S. vesicarium* avait développé de la résistance aux fongicides en Ontario et dans l'état de New-York, principalement au groupe 11 (Gossen et al. 2021 ; Hay et al. 2019). Les niveaux de résistance élevés peuvent compromettre l'évaluation de l'efficacité des fongicides, comme c'était le cas pour *S. vesicarium* en Ontario (Gossen et al. 2021). Il pourrait donc être important de documenter la résistance de *S. vesicarium* aux fongicides.
- Enfin, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet pourraient être transférés à d'autres cultures, par exemple pour les producteurs d'asperges, qui sont également aux prises avec ce pathogène.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Hervé Van Der Heyden

Phytopathologiste

Phytodata

291 rue de la Coopérative

Sherrington

514-617-4986

hvanderheyden@phytodata.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ce projet a été réalisé dans le cadre du volet 4 du programme Prime-Vert – Appui au développement et au transfert de connaissances en agroenvironnement avec une aide financière du ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation par l’entremise de la Stratégie phytosanitaire québécoise en agriculture 2011-2021. L’équipe de réalisation souhaite également remercier les producteurs participants.

Références :

- Farr, D.F., & Rossman, A.Y.** Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved November 14, 2017. Misawa, T. & Yasuoka, S. The life cycle of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of Welsh onion leaf blight J Gen Plant Pathol (2012) 78: 18.
- Lorbeer, J.W.**, 1993. A serious outbreak of Stemphylium leaf blight of onion in New York. In: Proceedings of the 1993 National Onion Research Conference. Ithaca, NY, USA.: Cornell University, pp. 32–37.
- Rossi, V., Pattori, E., and Bugiani, R.**, 2008. Sources and seasonal dynamics of inoculum for brown spot disease of pear. European Journal of Plant Pathology 121: 147–159.
- Rossi, V., Bugiani, R., Giosué, S., and Natali, P.**, 2005. Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. Aerobiologia Journal 21 (3–4): 203–216.
- Simmons, E.G.**, 1985. Perfect states of *Stemphylium*. Mycologia 38: 284-293.
- Prados-Ligero, A.M., Melero-Vara, J.M., Corpas-Hervías, C., and Basallote-Ureba, M.J.**, 2003. Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. European Journal of Plant Pathology 109(4): 301–310.
- Shishkoff, N. and Lorbeer, J.W.**, 1989. Etiology of *Stemphylium* leaf blight of onion. Phytopathology 79 (3): 301-304.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P., and Brunelli, A.**, 1995. Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. Phytopathology 85 (5): 586-592
- Basallote-Ureba, M.J., Prados-Ligero, A. M., and Melero-Vara, J.M.**, 1999. Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. Plant Pathology 48 (1): 139–145.
- Graf, S., Bohlen-Janssen, H., Miessner, S. et al.** Differentiation of *Stemphylium vesicarium* from *Stemphylium botryosum* as causal agent of the purple spot disease on asparagus in Germany. Eur J Plant Pathol (2016) 144: 411.
- Carisse, O., Lefebvre, A., Van der Heyden, H., Roberge, L., and Brodeur, L.** 2012b. Analysis of Incidence–Severity Relationships for Strawberry Powdery Mildew as Influenced by Cultivar, Cultivar Type, and Production Systems. Plant Disease 97:354-362.
- Carisse, O., Tremblay, D. M., Lévesque, C. A., Gindro, K., Ward, P., and Houde, A.** 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.
- McRoberts N, Hughes G, Madden LV.** The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. Annals of Applied Biology. 2003;142(2):191-211.

Spolti P, Shah DA, Fernandes JMC, Bergstrom GC, Del Ponte EM. Disease Risk, Spatial Patterns, and Incidence-Severity Relationships of Fusarium Head Blight in No-till Spring Wheat Following Maize or Soybean. *Plant Disease*. 2015;99(10):1360-6.

Carisse O, Lefebvre A, Van der Heyden H, Roberge L, Brodeur L. Analysis of Incidence–Severity Relationships for Strawberry Powdery Mildew as Influenced by Cultivar, Cultivar Type, and Production Systems. *Plant Disease*. 2012;97(3):354-62.

Dutilleul PRL. Spatio-temporal heterogeneity: concept and analyses. New York: Cambridge University Press; 2011. 393 p.

Gossen B, Tayviah CS, McDonald MR. The Role of Ascospores and Conidia, in Relation to Weather Variables, in the Epidemiology of Stemphylium Leaf Blight of Onion. 2021, *Plant Disease* 0 0:ja.

Hay F, Sharma S, Hoepfing C, Strickland D, Luong K, Pethybridge SJ. Emergence of Stemphylium Leaf Blight of Onion in New York Associated with Fungicide Resistance. *Plant Disease* 2019 103:12, 3083-3092.