



PCAA

Programme canadien d'adaptation agricole

Rapport final

Déploiement d'un dispositif de surveillance de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides dans les cultures de fraises, framboises et vignes

Titre du projet

6706

Numéro du projet

Compagnie de Recherche Phytodatainc.

Nom du demandeur

Avril 2012-Janvier 2014

Période couverte par le rapport

Rédigé par : **Hervé Van der Heyden**

Chargé de projets

31 janvier 2014

Date de dépôt du rapport final

Le rapport final, transmis au CDAQ en version papier et Word, doit inclure :

- les biens livrables décrits à l'annexe C de la convention de contribution financière;*
- les pièces justificatives, numérotées et inscrites dans le document Plan de financement et conciliation des dépenses;*
- les copies des documents de diffusion produits faisant mention de la contribution du PCAA selon les règles de visibilité du programme.*

Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) s'est engagé à travailler avec des partenaires de l'industrie. Les opinions exprimées dans le présent document sont celles du demandeur et ne sont pas nécessairement partagées par AAC et le CDAQ.

Table des matières

Objectifs.....	5
Objectif général	5
Objectifs spécifiques	5
Méthodologie et indicateurs de rendement	5
Objectif spécifique 1 : Réaliser une veille technologique continue (revue de littérature)	5
Objectif spécifique 2 : Identification des critères permettant le choix de l'emplacement des fermes sentinelles.....	5
Objectif spécifique 3 : Dresser un portrait de la résistance de <i>B. cinerea</i> aux fongicides pour les régions identifiées par le projet au Québec, en Nouvelle-Écosse, en Ontario et en Colombie-Britannique	6
Objectif spécifique 4: Comparer l'incidence des résistances avec les pratiques d'application des fongicides.....	6
Résultats et discussion	7
Résistance aux fongicides : revue de littérature	7
Détection de la résistance : méthodes et interprétation	8
Résistance aux fongicides: Réseau de sentinelle.....	10
Résistance aux fongicides: Inventaire et pratiques d'utilisation des fongicides	16
Conclusions.....	22
SOMMAIRE DES ACCOMPLISSEMENTS DU PROJET	22
Figure 1 : Exemples de résultats obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose, après digestion enzymatique. La présence d'un échantillon résistant est indiqué par A) un fragment unique de 1030-pb pour la résistance aux dicarboximides, B) deux fragments de 318 et 242-pb pour la résistance aux strobilurines, C) deux fragments de 85 et 35-pb pour boscalid 1 D) un fragment de 120-pb pour boscalid 2 E) deux fragments de 85 et 35-pb pour boscalid 3 F) deux fragments de 119 et 31-pb pour boscalid 4, G) deux fragments de 119 et 31-pb pour la résistance au boscalid 5.....	9
Figure 2 : Exemple de résultats d'analyse pour la résistance au fenhexamide. A) échantillon positif pour le phénotype sensible et B) échantillon résistant au fenhexamide.	10
Figure 3 : Résultats des analyses de 100 simulations (échantillonnage aléatoire avec remise) obtenus à partir de 1000 échantillons recueillis dans un vignoble de Dunham, Québec. La moyenne observée pour l'échantillon de base est de 59%.	13
Figure 4 : Résultats des analyses de 100 simulations (échantillonnage aléatoire avec remise) obtenus à partir de 1000 échantillons recueillis dans un vignoble de Dunham. La moyenne observée pour l'échantillon de base est de 19%.	13
Figure 5 : Résultats des analyses de 100 simulations (échantillonnage aléatoire avec remise) obtenus à partir de 1000 échantillons recueillis dans un vignoble de Dunham. La moyenne observée pour l'échantillon de base est de 47%.	14
Figure 6 : Variation des pourcentages de résistants obtenus lors de l'échantillonnage des fermes sentinelles (100 échantillons par ferme) et de l'échantillonnage des fermes individuelles (10 échantillons par ferme) pour A) la fraise, B) la framboise et C) la vigne pour 2012 et 2013.	15

Figure 7 : Proportion d'isolats possédant les différentes mutations suivie au cours de ce projet en 2012 et 2013. La barre d'erreur représente l'erreur standard (SE).	16
Figure 8 : Distribution des fréquences des mutations retrouvées lors de l'inventaire de 2012 (haut) et 2013 (bas), par province.	17
Figure 9 : Distribution des fréquences des mutations retrouvées lors de l'inventaire de 2012 (haut) et 2013 (bas), par culture.	18
Tableau 1 : Variances observées en fonction du nombre d'échantillons prélevés lors des simulations.	14
Tableau 2 : Estimation des coûts d'opération pour le suivi d'une ferme sentinelle.	15

Objectifs

OBJECTIF GÉNÉRAL

Développer un réseau pilote de surveillance de la résistance aux fongicides basé sur le suivi de fermes sentinelles.

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

1. Réaliser une veille technologique continue.
2. Identifier les critères permettant le choix de l'emplacement des fermes sentinelles et estimation des coûts annuels.
3. Dresser un portrait de la résistance de *B. cinerea* aux fongicides pour les provinces identifiées par le projet (Québec, Nouvelle-Écosse, Ontario et Colombie-Britannique) à l'aide des outils de détection moléculaire.
4. Comparer l'incidence des résistances avec les pratiques d'utilisation des fongicides propres à chaque culture.

MÉTHODOLOGIE ET INDICATEURS DE RENDEMENT

Objectif spécifique 1 : Réaliser une veille technologique continue (revue de littérature)

Cet objectif consiste à faire une revue de la littérature en continue afin de rester à jour quant au développement et l'avancement des connaissances sur la résistance aux fongicides et l'identification de nouvelles mutations.

Indicateur de rendement : La revue de littérature est à jour.

Objectif spécifique 2 : Identification des critères permettant le choix de l'emplacement des fermes sentinelles

Dans 2 régions de production du Québec, 6 champs ont été identifiés en fonction de leur emplacement, du nombre d'années en opération, de leur superficie et des antécédents de moisissure grise. Sur chacune de ces fermes, 100 échantillons ont été prélevés aléatoirement en fin de saison de production lorsque les symptômes étaient apparents. Les échantillons de spores ont été prélevés en duplicata à l'aide d'un écouvillon sur 100 fruits infectés par la moisissure grise. Sur réception, l'ADN de l'écouvillon 1 a été extraite tandis que les spores contenues sur l'écouvillon 2 ont été conservés à 4°C pour des fins de réserves. La détection des mutations liées à la résistance aux fongicides a été réalisé par PCR selon les méthodes développées par Phytodata/AAC dans le cadre du projet RBPI #2043 - DPAI pour 1 mutation ayant une fréquence d'apparition élevée (> 50%) ainsi que pour une mutation ayant une fréquence d'apparition faible (< 20%). Les mutations relatives à la résistance aux dicarboximides et la mutation boscald 2 ont été sélectionnées.

Indicateur de rendement: Tous les sites prévus ont été échantillonnés dans les cultures de fraises, de framboises et de vignes. Tous les échantillons ont été analysés. Les analyses statistiques ont été réalisées.

Objectif spécifique 3 : Dresser un portrait de la résistance de *B. cinerea* aux fongicides pour les régions identifiées par le projet au Québec, en Nouvelle-Écosse, en Ontario et en Colombie-Britannique

En collaboration avec les différents partenaires du Québec, de l'Ontario, de la Nouvelle-Écosse et de la Colombie-Britannique, 5 à 10 producteurs ont été identifiés par province pour chacune des cultures ciblées par l'étude. Sur chacune des fermes, un minimum de 10 échantillons de spores a été prélevé en duplicité à l'aide d'un écouvillon sur 10 baies/fruits infectés par la moisissure grise. Les écouvillons ont alors été expédiés au laboratoire et conservés à 4°C jusqu'aux analyses.

Sur réception, l'ADN de l'écouvillon 1 a été extraite tandis que les spores contenues sur l'écouvillon 2 ont été maintenues à 4°C pour des fins de réserves. La détection des mutations liées à la résistance aux fongicides a été réalisée par PCR selon les méthodes développées par l'équipe de PhytoData/AAC dans le cadre du projet RBPI #2043 - DPAI pour les fongicides suivants : iprodione (1 mutation), boscalid (5 mutations), fenhexamide (3 mutations) et pyraclostrobin (1 mutation).

Pour la fraise et la framboise, deux périodes d'échantillonnage ont été ciblées en fonction du type de production; un échantillonnage de mi-saison pour les variétés conventionnelles, et un échantillonnage d'automne pour les fraises à jours neutres et les framboises d'automne. Pour la vigne, une seule période d'échantillonnage a été établie en fin de saison soit dans les 2 semaines précédant la récolte.

Indicateur de rendement: 1453 échantillons ont été reçus ou collectés en 2012 et 1293 échantillons ont été reçus ou collectés en 2013 dans le cadre de l'objectif spécifique 1 (un minimum de 600 échantillons par année était prévu). Ces échantillons provenaient de fraises, framboises, vignes, cerises et bleuets. Ils ont été caractérisés pour 10 mutations associées à la résistance à 4 fongicides.

Objectif spécifique 4: Comparer l'incidence des résistances avec les pratiques d'application des fongicides

Les objectifs 1 et 2 visent à établir un profil de résistance complet pour *B. cinerea* dans 3 différentes cultures. L'objectif 3 s'appuie sur l'hypothèse du fait que de décomposer le phénomène de résistance au niveau moléculaire facilite l'identification des liens qui peuvent exister entre les pratiques d'utilisation de fongicides et la proportion d'isolats résistants.

La comparaison entre l'incidence des différentes mutations et l'usage des fongicides sera possible grâce au grand nombre de sites échantillonnés dans différentes régions et pour différentes cultures. Pour étudier la relation entre incidence et usage, le cas du boscalid (Lance, Headline, Cantus, Cadence) sera approfondi en étude de cas. La résistance au boscalid peut être conférée par 5 mutations différentes, toutes localisées sur le même gène. Chacune de ces mutations a une occurrence théorique différente et chacune confère à *B. cinerea* un facteur de résistance variable. Ainsi, l'incidence et la stabilité de chacune de ces mutations pourraient être influencées par les patrons d'usage des fongicides pour différentes cultures, producteurs ou régions.

Les résultats obtenus lors de la réalisation des objectifs 1 et 2 seront utilisés et comparés aux pratiques des producteurs suivis. Les données individuelles recueillies quant à l'usage des fongicides resteront confidentielles, seules les analyses seront diffusées.

Indicateur de rendement : Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de l'objectif 1 ont été transférés aux producteurs et conseillers participants. Les résultats pour la résistance de *B. cinerea* au boscalid ont été compilés et regroupés par zone de production (MRC au Québec). Nous commençons à recevoir de l'information quant à l'utilisation du boscalid par les producteurs.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résistance aux fongicides : revue de littérature

Résistance aux anti-microtubules :

Les fongicides de la famille des benzimidazoles (bénomyl, carbendazim et thiophanate-méthyl) préviennent l'assemblage des microtubules en s'attachant à la β -tubuline, inhibant ainsi la croissance mycélienne et l'élongation du tube germinatif. Les premiers cas de résistance aux benzimidazoles ont rapidement été identifiés, peu après l'introduction de cette classe de fongicides (Leroux et Clerjeaux, 1985). Dans le cas des benzimidazoles, le phénotype résistant a été associé à une mutation sur le gène codant pour la β -tubulin (Leroux et al., 2010). Au Canada, l'homologation des benzimidazoles a été retirée en 2003.

Résistance aux dicarboximides et aux phénylpyrroles :

Les dicarboximides (iprodione, vinclozolin et procymidone) et les phénylpyrroles (fludioxinil et pyrrolnitril) affectent tous l'osmorégulation cellulaire. Le(s) site(s) d'action(s) précis de ces fongicides n'ont pas encore été élucidés, mais ils semblent interférer avec l'action d'une histidine kinase (Cui et al., 2004). Ces fongicides affectent la transduction du signal osmotique, menant à une accumulation létale de glycérol à l'intérieur de la cellule (Ochiai et al., 2001). Dans le cas des dicarboximides, le phénotype résistant a été associé à une mutation majeure sur le gène de cette histidine kinase.

Résistance aux anilinopyrimidines :

Les anilinopyrimidines (pyriméthanil, mepanipyrim et cyprodinil) sont des inhibiteurs de la biosynthèse de la méthionine. Le ou les sites d'actions des anilinopyrimidines n'ont pas encore été identifiés à ce jour, malgré l'identification de cibles potentielles : la cystathionine β -lyase et la cystathionine γ -synthase (Leroch et al., 2011; Leroux et al., 2002). Aucune mutation n'a pu être associée au phénotype résistant, mais de récents résultats ont démontré que des gènes associés à la résistance multiple pourraient être impliqués.

Résistance aux inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS)

Parmi les fongicides du groupe des IBS, seul le fenhexamide est homologué au Canada pour le contrôle des *Botrytis*. Ces fongicides inhibent une enzyme (3-ketoreducatse) impliquée dans la dé-méthylation des stérols (Leroux et al., 2002). En France, la résistance au fenhexamide a été détectée seulement 4 ans après l'introduction commerciale du fongicide. Pour ce fongicide, le phénotype résistant peut être décomposé en 3 groupes :

Hyd1, Hyd3⁻ et Hyd3⁺. Le phénotype Hyd1 est associé à la détoxification du fenhexamide et serait caractéristique d'une nouvelle espèce cryptique de *Botrytis*: *Botrytis pseudocinerea*. Cette nouvelle espèce pourrait avoir fait son apparition avant l'introduction du fenhexamide. Ce phénotype est considéré en Europe comme ayant peu d'importance comparé aux phénotypes Hyd3. Par ailleurs, nous ne savons si cette sous-espèce de *Botrytis* est présente au Québec ou au Canada. Le phénotype Hyd3⁻ peut être la résultante de différentes mutations, mais confère à *Botrytis* le caractère résistant uniquement lors de la germination des spores (Fillinger et al., 2008). Le phénotype Hyd3⁺ est de loin le plus important. Il peut être causé par différentes mutations et cause la résistance à la fois lors de la germination des spores et de la croissance mycéienne.

Résistance aux strobilurines (QoI) :

Les QoIs inhibent la respiration cellulaire en ciblant le complexe mitochondrial III, plus précisément en interférant avec le cytochrome b (Leroux et al., 2010). Les QoIs ne sont pas directement homologués pour le contrôle des *Botrytis*, mais sont fréquemment utilisés en combinaison avec d'autres botryticides, notamment avec boscalid. La résistance aux QoIs est très fréquente et est associée dans tous les cas à une mutation (G143A) dans le gène du cytochrome b.

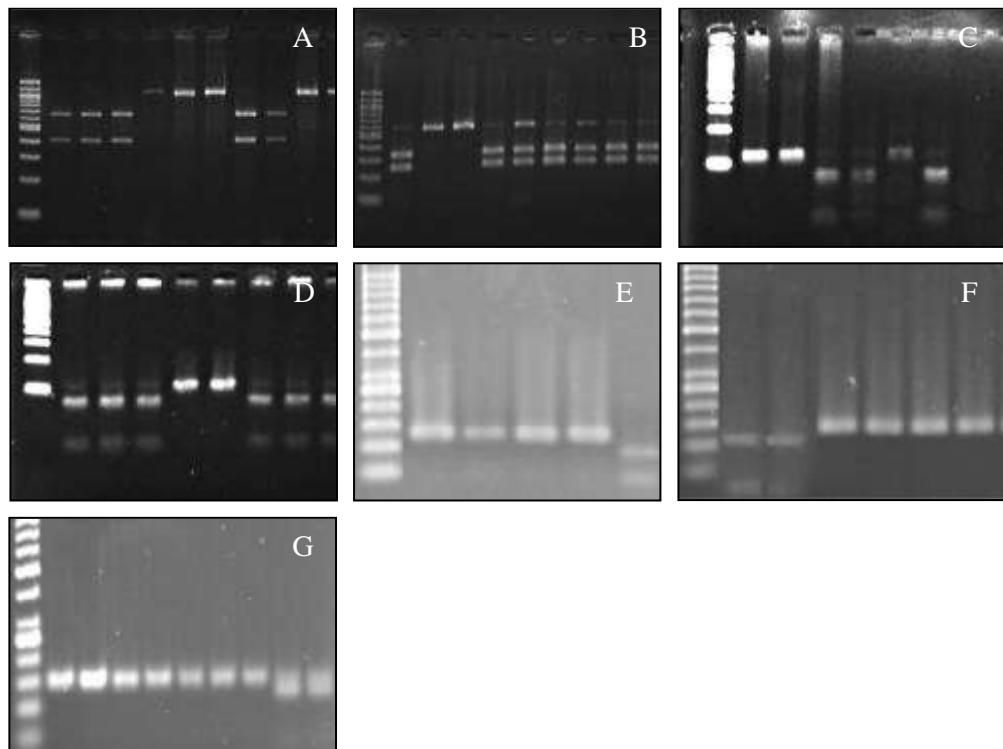
Résistance aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase :

Le boscalid a été le premier fongicide du groupe des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (ISDH) homologué pour le contrôle des *Botrytis*. Depuis, d'autres fongicides de ce groupe (penthiopyrade et fluopyram) se sont ajoutés à la liste des fongicides homologués. Les ISDH affectent eux aussi la respiration cellulaire, mais plutôt en interférant avec différentes sous-unités du complexe mitochondrial II (Leroux et al., 2010). C'est un des cas de résistance les plus complexes. Pour boscalid, le phénotype résistant peut être décomposé en 7 classes de résistance génotypique, toutes associées à des mutations différentes et nommées CAR1 à CAR7. Récemment, les génotypes CAR3 à CAR7 ont également été associés à une résistance au fluopyram.

Détection de la résistance : méthodes et interprétation

La détection de la résistance aux dicarboximides, aux strobilurines et au boscalid est réalisée par PCR-RFLP, tandis que la détection de la résistance au fenhexamide est réalisée par RT-qPCR. Ces techniques ont été développées dans le cadre du projet “**DPAI-Development of DNA technologies-based networks of inoculum and fungicide resistance tracking for improved management of potatoes, grapes, and green house tomatoes**”, par l’équipe de Phytodata en collaboration avec l’équipe du Dr. Odile Carisse.

Figure 1 : Exemples de résultats obtenus par électrophorèse sur gel d’agarose, après



digestion enzymatique. La présence d'un échantillon résistant est indiqué par A) un fragment unique de 1030-pb pour la résistance aux dicarboximides, B) deux fragments de 318 et 242-pb pour la résistance aux strobilurines, C) deux fragments de 85 et 35-pb pour boscalid 1 D) un fragment de 120-pb pour boscalid 2 E) deux fragments de 85 et 35-pb pour boscalid 3 F) deux fragments de 119 et 31-pb pour boscalid 4, G) deux fragments de 119 et 31-pb pour la résistance au boscalid 5.

Les tests de PCR-RFLP sont basés sur l'amplification d'un fragment d'ADN précis à l'intérieur duquel se trouve une mutation d'intérêt (i.e. associée à un phénotype résistant). Ainsi, des fragments de 1030-pb, 560-pb, 120-pb, 120-pb, 120-pb, 144-pb, 150-pb pour les dicarboximides, strobilurines, boscalid 1, boscalid 2, boscalid 3, boscalid 4 et boscalid 5 sont amplifiés, respectivement (Figure 1). Chaque fragment est ensuite digéré à l'aide d'une enzyme de restriction et le produit de la digestion est ensuite visualisé sur gel d'agarose. La taille des fragments obtenus suite à cette digestion indique la présence ou l'absence de la mutation recherchée. Par exemple, dans le cas de la résistance aux

dicarboximides, la présence d'un fragment unique de 1030-pb indique l'existence de la mutation associée au phénotype résistant alors que la présence de deux fragments (630 et 400-pb) suggère l'absence de la mutation d'intérêt (Figure 1).

La technique utilisée pour la détection des mutations associées à la résistance au fenhexamide repose sur l'utilisation d'une sonde TaqMan spécifique au site de mutation et est réalisée en PCR quantitatif. La particularité de ce test réside dans la haute spécificité des sondes pour une seule mutation. Chaque échantillon est testé pour les trois mutations associées à la résistance au fenhexamide, en plus du phénotype sensible (Figure 2).

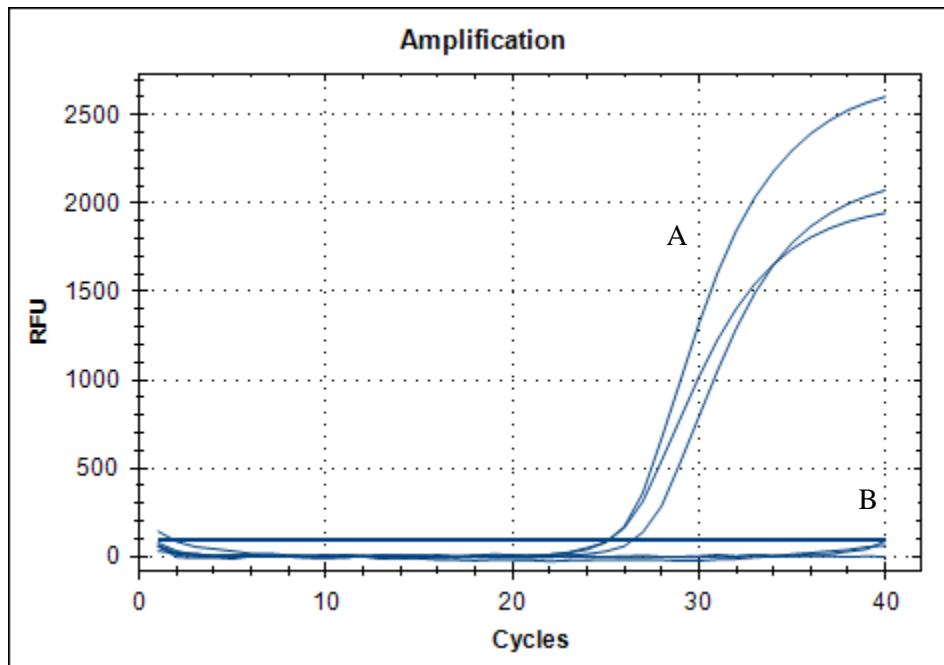


Figure 2 : Exemple de résultats d'analyse pour la résistance au fenhexamide. A) échantillon positif pour le phénotype sensible et B) échantillon résistant au fenhexamide.

Résistance aux fongicides: Réseau de sentinelle

Avant d'entreprendre un suivi de la résistance aux fongicides, il est important de faire la différence entre les différents objectifs sous jacent à l'échantillonnage et d'identifier celui qui convient au projet de suivi du réseau sentinelle. Ainsi, on peut distinguer trois objectifs d'échantillonnage généraux: détermination de la sensibilité de base (baseline), réalisation d'un inventaire régional (petite ou grande échelle), suivi et bio-surveillance.

Dans un contexte de résistance aux fongicides, la sensibilité de base est définie comme étant un profil de la sensibilité du pathogène cible obtenu à l'aide de tests de détection classique ou moléculaire, afin de mesurer la réponse d'un individu ou d'une population non exposée à un fongicide et d'obtenir un patron de distribution (Russel, 2004). Lorsque cet objectif est mis de l'avant, l'échantillonnage est ponctuel et doit avoir lieu dans des sites où le fongicide d'intérêt n'a jamais été utilisé. Ainsi, pour réaliser ce type d'échantillonnage, il n'est pas nécessaire de détenir de l'information précise en ce qui a trait à l'incidence ou à la distribution spatiale des individus résistants et le nombre d'échantillons qui doit être recueilli est uniquement fonction de la précision que l'on désire obtenir (Carisse et Van der Heyden, 2014). En résumé, l'échantillonnage pour

déterminer la sensibilité de base est réalisé selon un patron aléatoire conventionnel, comme l'échantillonnage en « W ». Puisque la sensibilité de base sert de point de référence pour suivre l'évolution des changements, ce type d'échantillonnage doit représenter toute la variabilité au sein de la population à l'étude. (Dans le cadre de ce projet, l'étude de la sensibilité de base ne faisait pas partie des objectifs fixés au début du projet.)

Les inventaires (locaux, régionaux ou nationaux) exécutés dans un contexte de résistance aux fongicides sont généralement effectués sur de courtes périodes (1 an) et doivent être répétés à intervalles réguliers (par exemple tous les 5 ans). L'objectif de ces inventaires est généralement de détecter la résistance, d'estimer sa prévalence dans différentes populations et parfois d'étudier l'impact de différents facteurs sur l'importance du phénomène de résistance. Au sens statistique, un recensement implique généralement l'échantillonnage de tous les individus d'une population. Cependant, les populations de champignons pathogènes sont bien sur trop importantes pour que les inventaires soient conduits sur chaque individu. En pratique, on préfère l'inventaire au recensement qui peut être conduit en sous échantillon, permettant ainsi l'exploration de plusieurs unités d'échantillonnage. La réalisation d'un inventaire inclus plusieurs étapes allant de la définition de l'objectif principal à l'analyse des échantillons, en passant par l'identification de la stratégie d'échantillonnage la plus adéquate. Ainsi, la préparation d'un inventaire devrait tenir compte des questions suivantes :

1. Quel est l'objectif d'échantillonnage? Dans le cadre de ce projet, l'objectif de l'inventaire était d'obtenir une estimation fiable de la proportion d'individus résistant à différents fongicides, au sein de populations de *Botrytis cinerea* dans les cultures de la vigne, la fraise et la framboise au Canada.
2. Quel est le cadre de travail? Le projet a été réalisé sur une période de deux ans, dans quatre provinces canadiennes. Nous ciblions un minimum de cinq fermes par culture, dans chaque province et un total de 10 échantillons par ferme était requis.
3. Quelle est la précision requise? Dans le cadre de ce projet, le coefficient de variation a été fixé à 0.3 (30% d'erreur). Ainsi, une incidence mesurée de 10% peut varier dans les faits entre 7 et 13% et une incidence de 65% varie entre 45.5 et 84.5%.
4. Comment les résultats seront-ils analysés et présentés? Dans le cadre de ce projet, les résultats ont été présentés sous formes d'histogrammes et analysés par province et par culture.

Enfin, l'échantillonnage de la résistance peut être inclus dans le cadre d'un programme de bio-surveillance. Dans le contexte de la résistance aux fongicides, la surveillance ou bio-surveillance est définie comme étant la collection et l'analyse structurée de données servant à détecter l'émergence d'individu résistant au sein d'une population ou bien, à démontrer qu'il y a absence d'individu résistant au sein d'une population. Le suivi est, quant à lui, conduit afin de détecter des changements dans les niveaux de résistance au sein des populations étudiées. La grande différence entre les deux réside sur le fait que la surveillance concerne la détection hâtive, alors que le suivi concerne la résistance qui a déjà été détectée. En pratique, surveillance et suivi sont réalisés lors de la même opération d'échantillonnage. Aucun seuil n'a encore été identifié quant à la proportion d'individus

résistants au delà duquel un fongicide commence à perdre de son efficacité, certains auteurs ayant suggéré des proportions entre 1 et 10% (Brent et Hollomon, 2007). Cependant, il est primordial de connaître ces seuils pour effectuer un échantillonnage dans le cadre d'un programme de détection hâtive. Le suivi doit être conduit sur une base régulière, idéalement sur une base annuelle. Ces données peuvent être intégrées aux programmes de lutte intégrée afin d'évaluer les stratégies anti-résistances. Pour cet usage, le suivi doit être réalisé de façon continue, à l'échelle de la ferme ou à une échelle régionale.

L'utilisation d'un réseau de fermes sentinelles pour le suivi de la résistance aux fongicides permettrait de répondre à cet objectif d'échantillonnage. La principale contrainte à l'implantation d'un tel réseau est la taille de l'échantillon requise pour diminuer le coefficient de variation. Afin d'illustrer l'impact qu'a la taille de l'échantillon sur la précision de l'estimation des proportions d'individus résistants, un jeu de données contenant 1000 échantillons de *B. cinerea* a été utilisé. Pour cette analyse, ces 1000 échantillons, caractérisés pour une mutation responsable d'une résistance au dicarboximides (IMIR1) et pour deux mutations responsables d'une résistance au bosalide (CAR1 et CAR2), représentaient une population. À l'aide de simulations, un échantillonnage avec remise a été réalisé et répété 100 fois pour chaque taille d'échantillons de 10, 25, 50 et 100 échantillons. Cette analyse a été répétée pour les trois mutations. Lorsqu'on procède à l'échantillonnage, comme la population entière n'est pas échantillonnée, une certaine incertitude est associée à l'estimation de la proportion d'individus résistants (figures 3-5).

Pour une incidence moyenne de 0.59, la variance observée diminue d'un facteur de 10 si l'on passe de 10 échantillon (variance = 0.024) à 100 échantillons (variance = 0.003) (Tableau 1). Pour une incidence moyenne de 0.19, on diminue également la variance d'un facteur d'un peu plus de 10 en passant de 10 échantillons (variance = 0.036) à 100 échantillons (variance = 0.003) (Tableau 1). Ainsi, la variance observée lors de ces simulations d'échantillonnage peut être contrôlée par la taille de l'échantillon.

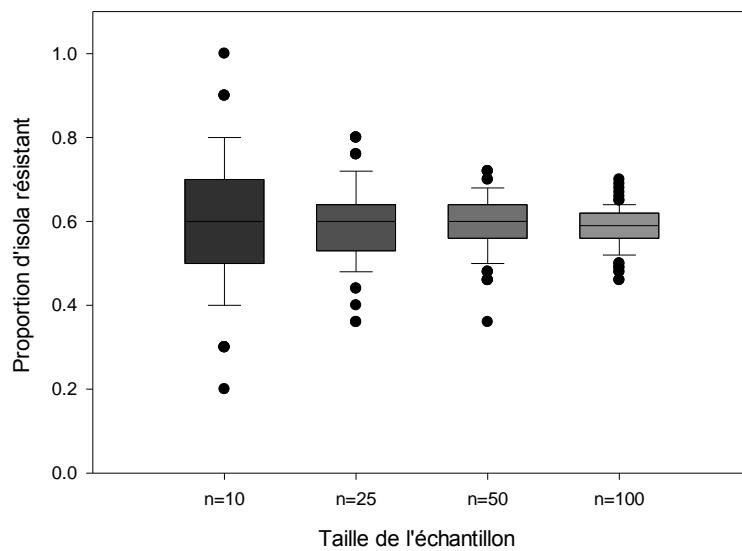


Figure 3 : Résultats des analyses de 100 simulations (échantillonnage aléatoire avec remise) obtenus à partir de 1000 échantillons recueillis dans un vignoble de Dunham, Québec. La moyenne observée pour l'échantillon de base est de 59%.

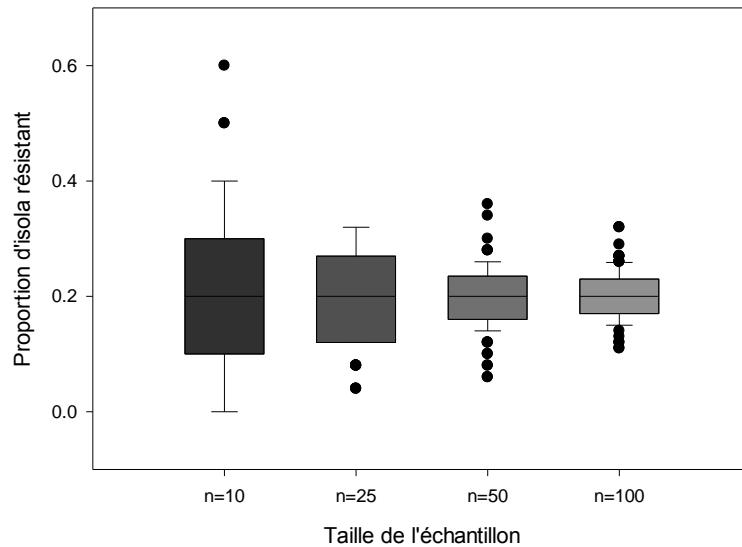


Figure 4 : Résultats des analyses de 100 simulations (échantillonnage aléatoire avec remise) obtenus à partir de 1000 échantillons recueillis dans un vignoble de Dunham. La moyenne observée pour l'échantillon de base est de 19%.

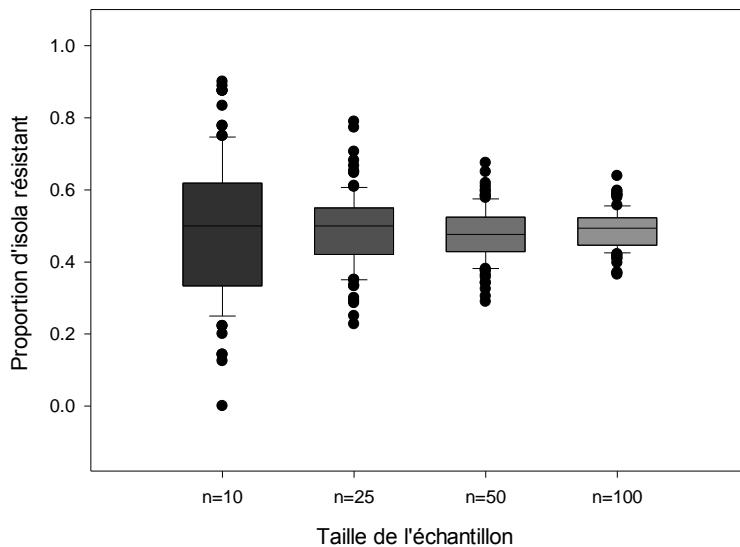


Figure 5 : Résultats des analyses de 100 simulations (échantillonnage aléatoire avec remise) obtenus à partir de 1000 échantillons recueillis dans un vignoble de Dunham. La moyenne observée pour l'échantillon de base est de 47%.

Tableau 1 : Variances observées en fonction du nombre d'échantillons prélevés lors des simulations.

Mutation	Proportion d'individus résistants	n= 10	n= 25	n= 50	n= 100
IMIR1	0.59	0.024	0.008	0.005	0.003
CAR2	0.19	0.036	0.011	0.006	0.003
CAR1	0.47	0.025	0.009	0.005	0.002

Le potentiel d'utilisation des fermes sentinelles a été validé dans le cadre de ce projet de recherche. Le pourcentage d'individus résistant obtenus à l'aide de 100 échantillons recueillis sur les fermes sentinelles a été comparé à la moyenne québécoise ainsi qu'aux valeurs obtenues sur cinq fermes de la région, sélectionnées aléatoirement. Pour atteindre cet exercice, deux mutations ont été sélectionnées en fonction de leur proportion relative dans les populations de *B. cinerea* (IMIR1 et CAR2). L'utilisation des fermes sentinelles a été étudiée pour la fraise, la framboise et la vigne, en 2012 et 2013.

Dans tous les cas, l'échantillonnage des fermes sentinelles a permis d'obtenir un résultat similaire à la moyenne provinciale (Figure 6). Pour la fraise, on obtient des moyennes de 17.8 et 70.5% pour CAR2 et IMIR1 alors que la moyenne provinciale est de 15.9 et 65.5%. Le résultat du suivi individuel varie cependant de 0 à 40% pour CAR2 et de 10 à 90% pour IMIR1 (Figure 6 A). Pour la framboise, on obtient des moyennes de 12.9 et 75.5% pour CAR2 et IMIR1 alors que la moyenne provinciale est de 23.3 et 70%. Le résultat du suivi individuel varie cependant de 0 à 70% pour CAR2 et de 40 à 90% pour IMIR1 (Figure 6B). Pour la vigne, on obtient des moyennes de 17.8 et 70.5% pour CAR2 et IMIR1 alors que la moyenne provinciale est de 15.9 et 65.5%. Le résultat du suivi individuel varie cependant de 0 à 40% pour CAR2 et de 0 à 90% pour IMIR1 (Figure 6C). Ces résultats suggèrent donc

que l'utilisation des fermes sentinelles pourrait être une solution viable pour contourner le problème lié à la taille de l'échantillon.

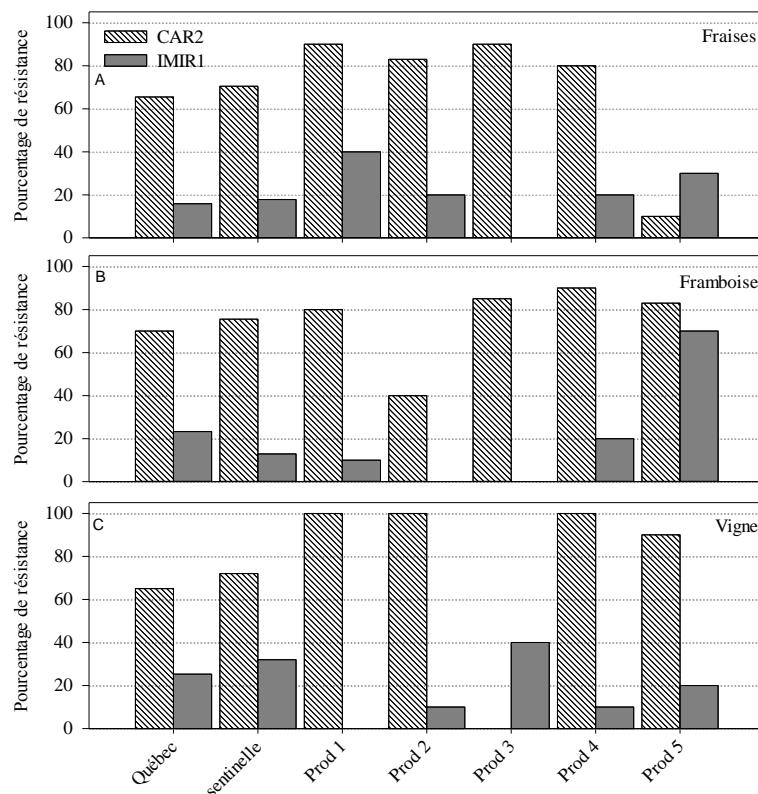


Figure 6 : Variation des pourcentages de résistants obtenus lors de l'échantillonnage des fermes sentinelles (100 échantillons par ferme) et de l'échantillonnage des fermes individuelles (10 échantillons par ferme) pour A) la fraise, B) la framboise et C) la vigne pour 2012 et 2013.

Les coûts d'opération pour le suivi d'une ferme sentinelle sont résumés dans le tableau 2. Ainsi, pour chaque ferme sentinelle, il en coûterait 4800\$ pour échantillonner et traiter les 100 échantillons. Les analyses suggérées comprennent la détection de 11 mutations liées à la résistance de 5 fongicides et l'identification du biotype de *B. cinerea* (Pseudo ou groupe S). À titre de comparaison, au laboratoire «Turf pathology/BreedingLaboratory » situé au Massachusetts, le tarif pour la détection de la résistance à quatre fongicides est fixé à 2210\$/50 échantillons. Au laboratoire de diagnostic de Guelph, il en coûte 4800\$/50 échantillons pour quatre fongicides alors qu'au laboratoire de diagnostic en phytoprotection, le coût est de 80\$/échantillon pour 3 fongicides plus 13\$ supplémentaires pour chaque fongicide additionnel.

Tableau 2 : Estimation des coûts d'opération pour le suivi d'une ferme sentinelle.

Poste budgétaire	Coûts
Echantillonnage	160\$
Ecouvillons	45\$

Extraction d'ADN	150\$
PCR	806\$
Digestion enzymatique	1280\$
Consumables divers	528\$
Main d'œuvre	1831\$
Total	4800\$

En fonction de la provenance des échantillons reçus en 2012 et 2013, il serait possible d'envisager sept zones de production où une ferme sentinelle serait implantée : Estrie, Ste-Hyacinthe, Ile d'Orléans, Trois-Rivières, Dunham, Napierville et Lanaudière. Comme la proportion d'individus résistant demeure relativement constante sur une période de deux ans (2 ans étant le plus long historique disponible), ces sept fermes sentinelles pourraient être échantillonées en alternance une année sur deux. Le choix des fermes sentinelles devra être fait en collaboration avec le milieu.

Résistance aux fongicides: Inventaire et pratiques d'utilisation des fongicides.

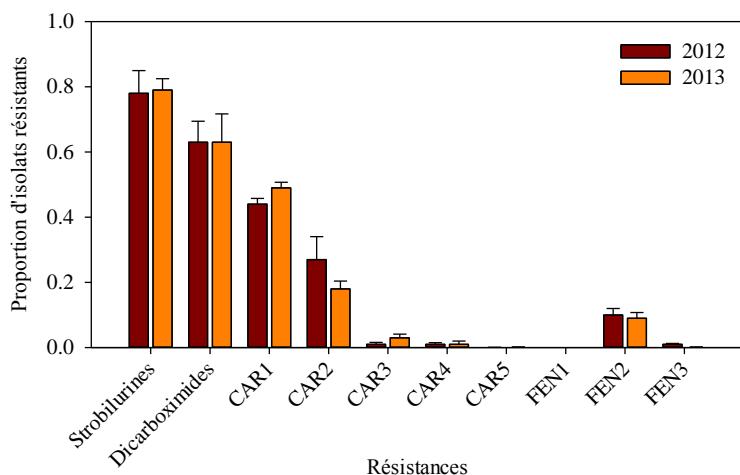


Figure 7 : Proportion d'isolats possédant les différentes mutations suivie au cours de ce projet en 2012 et 2013. La barre d'erreur représente l'erreur standard (SE).

En moyenne, 80% et 77% des échantillons analysés se sont avérés être résistants aux strobilurines en 2012 et 2013, respectivement. Pour ce qui est de la résistance au dicarboximides, 63% des échantillons se sont avérés être résistants en 2012 et 2013 (Figure 7). Globalement, 73% et 71% des échantillons étaient résistants au boscalid pour 2012 et 2013 (Figure 7).

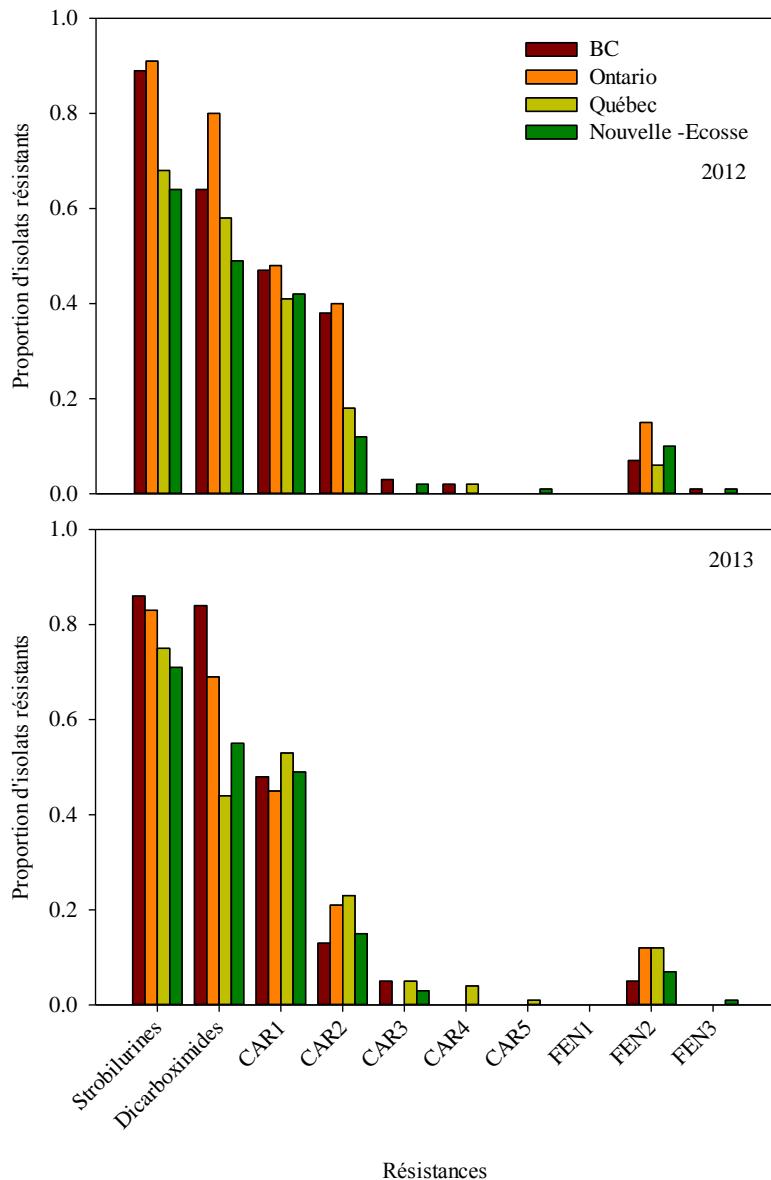


Figure 8 : Distribution des fréquences des mutations retrouvées lors de l'inventaire de 2012 (haut) et 2013 (bas), par province.

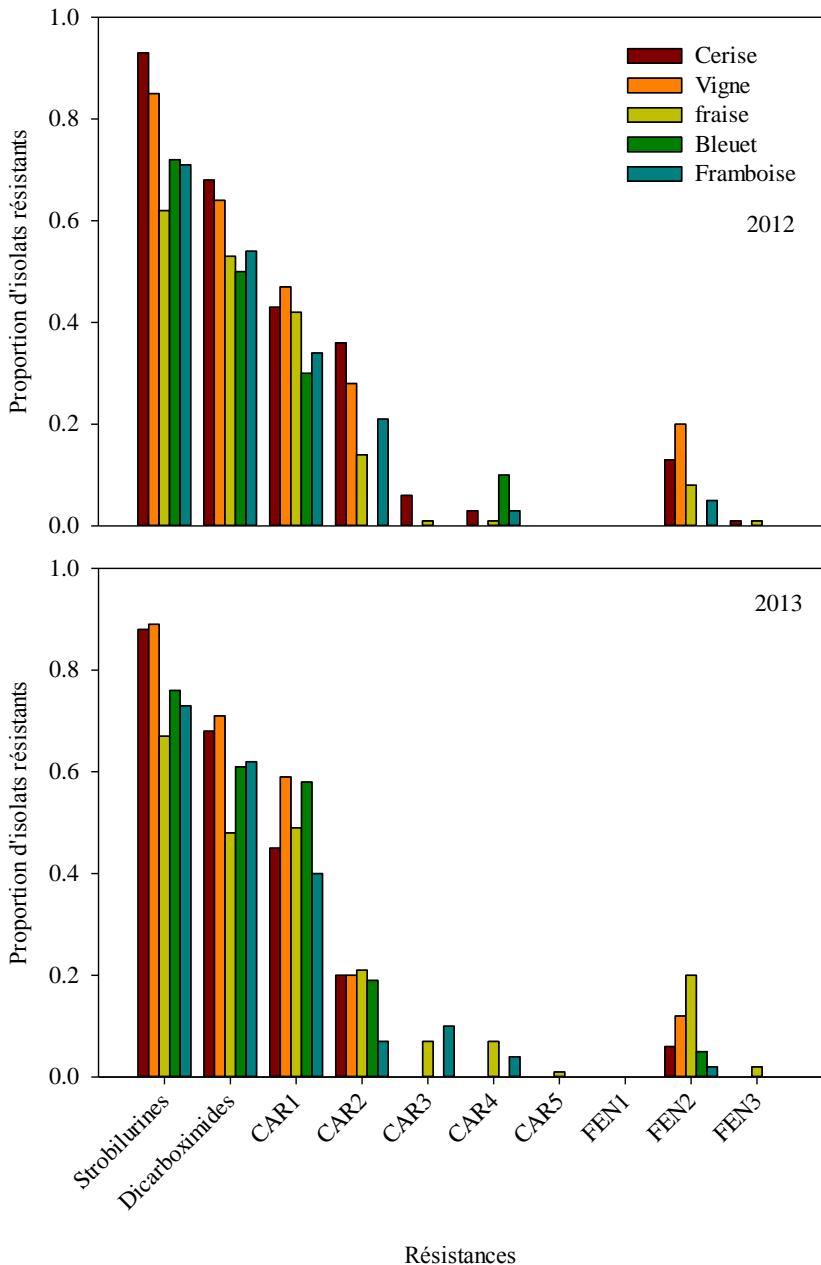


Figure 9 : Distribution des fréquences des mutations retrouvées lors de l'inventaire de 2012 (haut) et 2013 (bas), par culture.

Si l'on décompose le phénomène de résistance au boscalid pour 2012 et 2013, 44% et 49% des échantillons recueillis possédaient la mutation CAR1; 27% et 18% possédaient la mutation CAR2; 1% et 3% possédaient la mutation CAR3; 1% des échantillons possédaient la mutation CAR4 et aucun échantillon ne possédait la mutation CAR5. Enfin, 11% et 9% des échantillons étaient résistants au fenhexamide (Figure 7). En décomposant la résistance au fenhexamide, on constate qu'une mutation (FEN2) est prédominante et présente à hauteur de 10% et 9% en 2012 et 2013. En 2012, 1% des échantillons possédaient la mutation FEN3 (Figure 7).

En 2012 et 2013, les proportions d'isolats résistants sont un peu plus élevées en Colombie-Britannique ainsi qu'en Ontario pour les strobilurines et les dicarboximides tandis que la résistance au boscalid est plus élevée en Colombie-Britannique et en Ontario (2012 seulement) (Figure 8). Pour ce qui est du Québec et de la Nouvelle-Écosse, les niveaux de résistances sont équivalents (Figure 8). Lorsque l'on compare les données par culture, il est intéressant de constater que les niveaux de résistances observés sont un peu plus élevés dans les cultures de la cerise et de la vigne, par rapport aux fraises, framboises et bleuet, particulièrement en 2012 (Figure 9).

En ce qui a trait aux pratiques d'utilisation des fongicides, il ne semble pas y avoir de relation claire entre l'utilisation des fongicides et le développement de résistance, si ce n'est du nombre d'applications reçus par la culture. Par exemple, dans la production de fraises conventionnelles, où les niveaux de résistances sont les plus bas, la culture reçoit moins d'application de fongicides que les cultures de vignes ou de cerises.

DIFFUSION DES RÉSULTATS

*Supprimer ou ajouter les activités qui s'appliquent à votre projet et remplir les colonnes suivantes.
Annexer au rapport les documents de diffusion produits.*

Activités prévues de l'ANNEXE A	Activités réalisées	Description (thème, titre, endroit, etc.)	Date de réalisation	Nombre de personnes rejoindes	Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)
Publication	Brochure de l'association des producteurs de fraises et framboises du Québec	Les nouvelles fraîches: liste des projets appuyés par la fédération.	Avril 2012	750 membres	Titre du projet seulement
Présentation	Présentation du projet de recherche	La résistance de <i>Botrytis cinerea</i> aux fongicides: êtes-vous résistants? Journées Horticoles de Saint-Rémi	Décembre 2012	Plus de 250 producteurs et conseillers	Logo et mention
Présentation d'une affiche	Présentation d'une affiche	Implementation of a DNA based surveillance network of fungicide resistance in <i>Botrytis cinerea</i> populations. Ontario fruit and vegetable convention	Février 2013	Près de 2000 producteurs et conseillers	Logo et mention
Présentation	Présentation	Intégration des techniques de biologie moléculaire, de modélisation et d'analyse spatiale pour le suivi de l'inoculum aérien au niveau	Novembre 2013	Près de 250 producteurs et conseillers	Logo et mention

<i>Activités prévues de l'ANNEXE A</i>	<i>Activités réalisées</i>	<i>Description (thème, titre, endroit, etc.)</i>	<i>Date de réalisation</i>	<i>Nombre de personnes rejointes</i>	<i>Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)</i>
		régional et parcellaire			
Présentation	Présentation	Fongicides contre <i>Botrytis</i> : résistance sous haute surveillance ! 18ième Edition 'Les Journées Horticoles'.	Décembre 2013	Près de 250 producteurs et conseillers	Logo et mention
Publication dans une revue scientifique	Publication dans une revue scientifique	The changing landscape of fungicide insensitivity in crop pathogens in Canada, 2014. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014	Janvier 2014	De nombreux chercheurs, agronomes, étudiants, etc.	Mention

Conclusions

À court terme, ce projet de recherche a permis de mettre en lumière l'ampleur du phénomène de résistance à l'échelle régionale, provinciale et nationale. Ce projet a également permis d'établir de précieuses collaborations entre l'équipe de recherche de Phytodata et les conseillers et chercheurs du Québec, de Nouvelle-Écosse, d'Ontario et de Colombie-Britannique. Le projet a également permis de mettre en évidence certaines lacunes quant à l'approche d'échantillonnage couramment utilisé dans les processus de détection de la résistance aux fongicides. Il est en effet courant de prélever entre 1 et 10 échantillons dans un champ ou sur une ferme pour estimer la présence de résistance. Il a été possible, dans le cadre de ce projet, d'illustrer l'effet de la taille de l'échantillon sur la variabilité des résultats mesurés. Ces résultats sont importants pour les suites du projet. Ils nous ont permis de démontrer que le problème de variabilité lié à l'échantillonnage peut être facilement contourné en augmentant la taille de l'échantillon, tout en réduisant le nombre de lieux échantillonnés. Ainsi, nous avons démontré que l'approche suggérée est tout à fait envisageable et qu'elle comporterait plusieurs avantages : elle serait moins coûteuse qu'un échantillonnage systématique individuelle (par ferme), elle nous permettrait d'avoir une réponse plus précise grâce au plus grand nombre d'échantillons. Cela nous permettrait de voir comment évolue le problème de résistance dans le temps, de prévoir les problèmes de résistance liés à l'introduction de nouveaux fongicides et de mesurer les changements au sein des populations de *B. cinerea*. Les coûts d'opération pour le suivi d'une ferme sentinelle a été fixé à un montant de 4800\$/année, pour un total de 100 échantillons traités. Il serait souhaitable, à la lumière des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, de suggérer que le Québec implante un minimum de sept fermes sentinelles qui pourraient être suivies en alternance une année sur deux. En collaboration avec les associations de producteurs, le MAPAQ et son réseau d'avertissement phytosanitaire (RAP), sept fermes devraient être sélectionnées dans les régions de l'Estrie, Ste-Hyacinthe, l'Île d'Orléans, Trois-Rivières, Dunham, Napierville et Lanaudière.

Plusieurs collaborations ont été établies avec des conseillers, chercheurs, agronomes et producteurs dans quatre provinces canadiennes. Ces collaborations faciliteront la mise en place du concept de réseau de fermes sentinelles au Québec. Les nombreuses présentations et publications réalisées dans le cadre de ce projet ont permis de rejoindre et de sensibiliser un grand nombre de conseillers, de chercheurs et producteurs face à l'importance du phénomène de résistance.

Pour les suites du projet, il est prévu que l'équipe de Phytodata rencontre les représentants des associations de producteurs et du MAPAQ afin d'élaborer un projet pilote de suivi de fermes sentinelles.

SOMMAIRE DES ACCOMPLISSEMENTS DU PROJET

Malgré l'importance croissante des enjeux reliés à l'utilisation des pesticides en général, les applications de fongicides représentent encore une composante clé dans tous les programmes de lutte intégrée. L'introduction et l'utilisation intensive de fongicides uni-sites depuis le début des années 80 s'est tout de même soldé par l'apparition et la sélection de souches résistantes à ces différentes classes de fongicides. Au Québec et au Canada, la

connaissance des niveaux de résistance est limitée et le nombre d'échantillons requis pour obtenir une réponse précise demeure un facteur limitant.

Ainsi, l'objectif de ce projet de recherche consistait à développer un réseau pilote de surveillance de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides, basé sur le suivi de fermes sentinelles.

En collaboration avec les chercheurs, agronomes, conseillers et producteurs de petits fruits de Nouvelle-Écosse, du Québec, d'Ontario et de Colombie-Britannique, un inventaire de la résistance a été réalisé dans les cultures de fraises, framboises, vigne, cerises et bleuets à l'aide de la technique de biologie moléculaire. De plus, le potentiel de suivi de fermes sentinelles a été évalué afin d'obtenir des données précises et fiables quant au niveau de résistance de *B. cinerea* à quatre familles de fongicides.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence le problème de variabilité lié à la taille de l'échantillon. Pour une incidence moyenne de 0.59, la variance observée diminue d'un facteur de 10 si l'on passe de 10 échantillon (variance = 0.024) à 100 échantillons (variance = 0.003). Pour une incidence moyenne de 0.19, on diminue également la variance d'un facteur d'un peu plus de 10 en passant de 10 échantillons (variance = 0.036) à 100 échantillons (variance = 0.003). Les résultats de cet inventaire pancanadien ont révélé pour 2012 et 2013, respectivement, des niveaux de résistance aux fongicides de 80% et 77% pour les strobilurines, de 63% pour les dicarboximides, de 73% et 71% pour le boscalid et de 11% et 9% pour le fenhexamide.

Nos résultats suggèrent donc que l'utilisation des fermes sentinelles pourrait être une solution viable pour contourner le problème lié à la taille de l'échantillon. Ainsi, il serait souhaitable que le Québec implante un minimum de sept fermes sentinelles qui pourraient être suivies en alternance une année sur deux. En collaboration avec les associations de producteurs, le MAPAQ et son réseau d'avertissement phytosanitaire (RAP), sept fermes devraient être sélectionnées dans les régions de l'Estrie, Ste-Hyacinthe, Ile d'Orléans, Trois-Rivières, Dunham, Napierville et Lanaudière.

Annexe 1 : Documents de diffusion

Présentation du projet, les nouvelles fraîches, avril 2012

Page 2 sur 4

LES NOUVELLES FRAÎCHES

Volume 1, numéro 4, avril 2012

à régler, mais celle-ci sera en vigueur dès 2012 et ouvre la porte sur une collaboration accrue entre nos deux associations de producteurs.

LES FRAÎCHES DE LA RECHERCHE

Projets appuyés

1. Évaluation du cloypralide, pendiméthaline et sulfentrazone dans la production de fraises en vue de leur homologation au Québec, Gilles D. Leroux, Université Laval.
2. Augmentation des rendements et diminution de l'incidence de la pourriture noire sur la fraise, Romain Caillard, Groupe Ascense et Franck Bosquain, Phytodata.
3. Tests d'efficacité de plusieurs fongicides (chimiques et biologiques) dans la fraise pour lutter contre le complexe de champignons causant la pourriture noire des racines, Pierre Lafontaine, CIEL.
4. Évaluation de l'efficacité de plusieurs fongicides contre le blanc du fraisier (*Sphaerotheca macularis*), Pierre Lafontaine, CIEL.
5. Adaptation de la méthode des plantes-réservoirs pour le contrôle des tétranyques sur le framboisier sous grand tunnel, Valérie Fournier, Université Laval.
6. Controlling soil borne pathogens in disease prone soils of strawberry fields, Kevin Schooley, Ontario Berry Grower Association.
7. Déploiement d'un dispositif de surveillance de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides dans les cultures de fraises, framboises et vignes, Hervé Van der Heyden, Compagnie de Recherche Phytodata inc.
8. Développement de nouvelles stratégies de fertilisation de la fraise à jour neutre, Stéphane P. Lemay, IRDA.

Le 8^e Symposium international de la fraise... Le Symposium international de la fraise, initiative de l'International Society for Horticultural Science, a lieu tous les quatre ans depuis près de 30 ans. En février dernier, le 7^e symposium avait lieu à Beijing, en Chine. Il réunissait plus de 1 000 chercheurs, producteurs, pépiniéristes, conseillers et autres acteurs du secteur pour cinq jours de conférences et de visites. Cet événement scientifique de haut niveau permet non seulement aux participants de connaître les résultats de la recherche de pointe dans la production de fraises, mais également de visiter les régions productrices. Ces événements ont précédemment eu lieu aux États-Unis, en Italie, en Australie, en Espagne, en Finlande et en Hollande. Le Dr Yves Desjardins de l'Université Laval, à la tête d'une délégation de chercheurs et de pépiniéristes

du Québec, a présenté cette année la candidature du Québec pour devenir hôte en 2016.

L'équipe a fait un excellent travail de relations publiques et une présentation professionnelle exposant tous les avantages de la ville de Québec en tant que centre de conférence et le dynamisme de la production de la fraise au Québec et en Ontario. En août 2016, c'est donc à Québec que se tiendra le 8^e Symposium international de la fraise!

L'Université Laval, l'Université de Guelph, Agriculture et Agroalimentaire Canada et votre association travailleront de concert pour faire de cet événement un succès et pour s'assurer des retombées positives pour le secteur des fraises d'ici.



De gauche à droite : Béatrice Demers, Chantal St-Martin, Simon Charbonneau, Richard Méthot, Louis Gosselin, Simon Parrot, Yves Desjardins

Certification CanadaGAP chez Loblaw

Les fournisseurs de Loblaw, que ce soit en entrepôt ou en livraison directe, ont reçu le mois dernier un courriel indiquant qu'ils devront fournir, d'ici le 30 juin 2012, un certificat CanadaGAP ou préciser leur intention l'obtenir dès la saison 2012. D'autres distributeurs envisageraient d'exiger cette même certification pour ses fournisseurs à compter de l'automne 2012.

IMPORTANT: avant de passer un audit, les entreprises doivent avoir des registres sur une période d'au moins 90 jours d'activités. C'est pourquoi Loblaw exige une preuve que les producteurs ont l'intention d'obtenir leur certification cette année, et non le certificat comme tel.

Pour en savoir plus sur CanadaGAP :
<http://www.canadagap.ca/fr/bienvenue-aux-canadagap.aspx>

Présentation, Journées horticoles, décembre 2012

La résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides : êtes-vous résistants ?

Odile Carrière
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Hervé Van der Heyden, Université McGill, Phytodata, et Agriculture et Agroalimentaire Canada

Résistance aux Fongicides
Définition

- Résistance individuelle**
Individu inhibé par un fongicide, en relation avec une ou des mutations génétiques
- Résistance populationnelle (pratique)**
Baisse de l'efficacité d'un traitement fongicide due à la présence d'individus résistant.

Résistance aux Fongicides : Historique

Mycorrhizal	Fongicide	Herbicide	Heudelotia
Botryotinia	+	-	-
Botryosphaeriaceae	+++	+++	+++
Biotique	+	-	-
Bactéries	+	-	-
DMs	+	-	-
QoIs	++	-	-
SDHs	+	-	-

Résistance aux Fongicides : Mécanismes

Mycorrhizal	Fongicide	Herbicide	Heudelotia
Botryotinia	+	-	-
Botryosphaeriaceae	+++	+++	+++
Biotique	+	-	-
Bactéries	+	-	-
DMs	+	-	-
QoIs	++	-	-
SDHs	+	-	-

Résistance aux Fongicides : Aspect phénotypique

Facteur de résistance (FR)

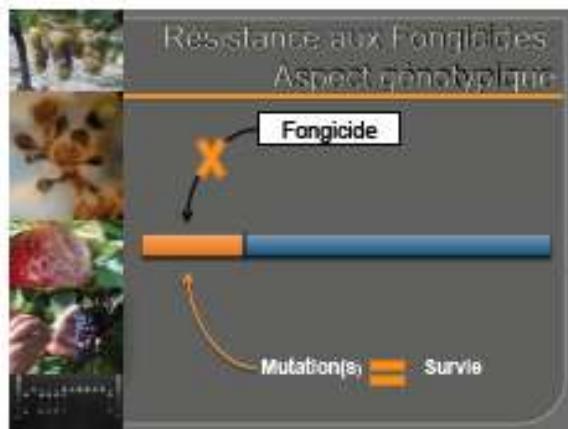
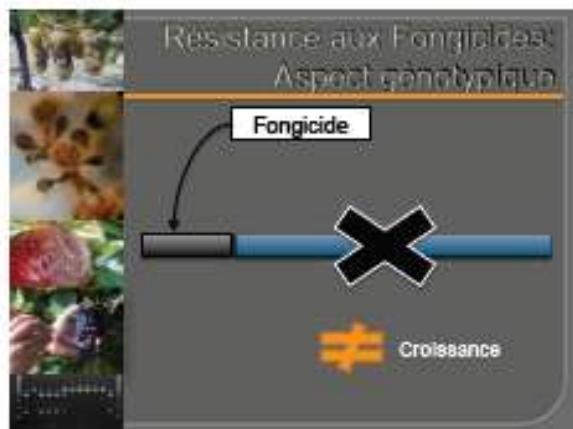
$$FR = \frac{CL_{50} \text{ individus Résistants}}{CL_{50} \text{ individus Sensibles}}$$

CL_{50} = [] qui inhibe 50% de la croissance

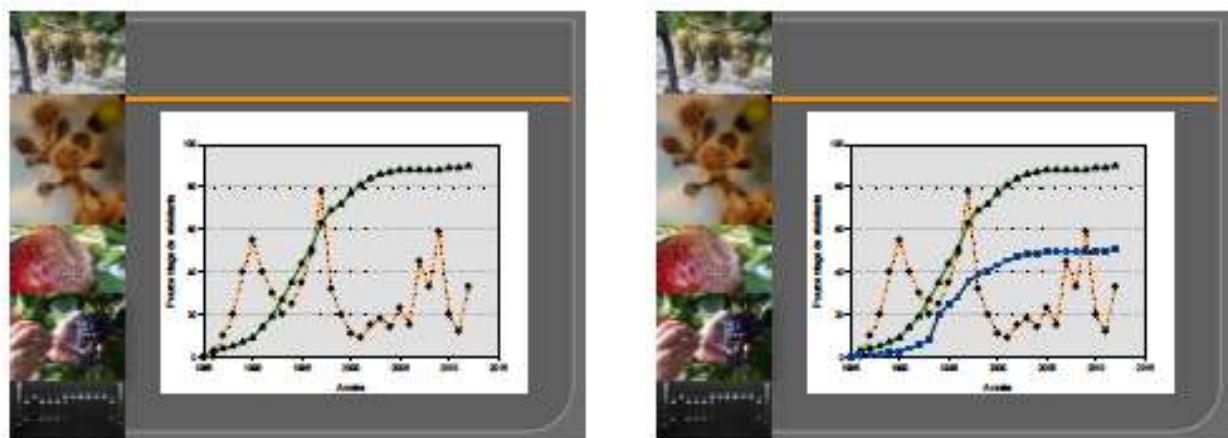
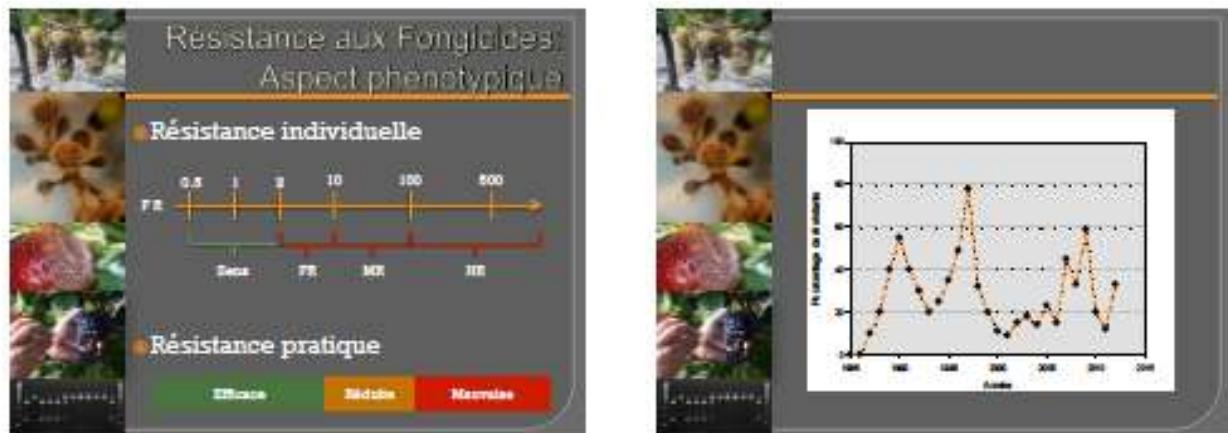
Ex:

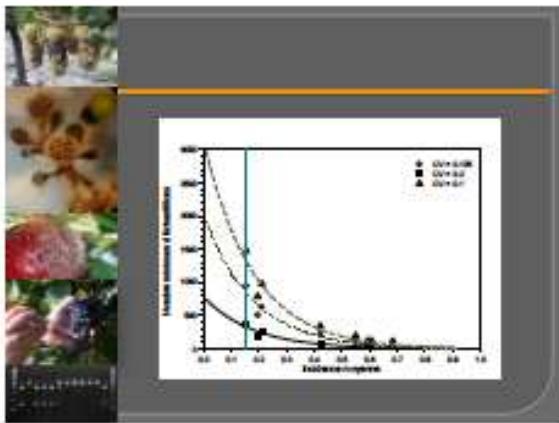
Résistance aux Fongicides phénotypique

Détection classique



- Résistance aux Fongicides
Aspect génotypique**
- Avantages
 - Plus rapide
 - Détection facteurs de résistance
 - Résistance croisée
 - Inconvénient
 - Équipements
 - Coût plus élevés (lorsque peu d'échantillons)





Affiche présentée, Ontario fruit and vegetable convention, février 2013

Implementation of a DNA based surveillance network of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* populations

H. Van der Heyden^{1,2,3}, L. Brodeur³, P. Dutilleul¹, A. Lefebvre¹, A. Levasseur¹, O. Carisse¹
¹Agriculture and AgriFood Canada, ²Département de Plant Science, McGill University, ³Phytodata Inc.

Corresponding author: hvanderheyden@phytodata.ca

Background and introduction

Botrytis cinerea is the causing agent of grey mould diseases in small-fruits and stone-fruit crops. World wide, 10% of the world fungicide market aim at controlling *Botrytis* induced diseases. With the increasing use of multiple fungicides, fungicide resistance has become a major concern for growers, crop specialists and the agrochemical industry. Fungicide resistance is a natural phenomenon and is the result of fungal adaptation to fungicide through genetic mutations. Depending on the fungicide mode of action, the genetic adaptation may be the result of a single gene or multiple gene mutations. Traditionally, to measure the level of resistance, the fungicide is cultured on growth media containing different concentrations of the fungicide or a fungicide concentration dilution series followed by visual and/or molecular methods. The fungicide concentrations which cause growth inhibition are determined by eye or by molecular methods such as PCR. This approach requires a large number of samples to be analyzed in order to reconstitute the population present in the field and hence to accurately estimate the level of resistance. However, because resistance is a result of a genetic mutation, it is possible to use molecular techniques to detect the presence of a mutation in the fungal genome. Molecular techniques do not require that the organism be cultured and hence it is possible to process a larger number of samples than with the traditional methods. Advances in molecular biology have provided new opportunities for rapidly detecting fungicide resistant genotypes once the mechanisms of resistance have been elucidated at a molecular level. Several molecular techniques, such as PCR, PCR-RFLP, PNA-PCR, allele-specific and real-time PCR have been used successfully to detect fungicide resistant genotypes of several plant pathogens. The adoption of DNA based tools for the detection and monitoring of fungicide resistance, to adapt sampling procedures to this new detecting techniques.

Objectives

- To provide a DNA based survey of *Botrytis cinerea* resistance to different classes of fungicides used in grapes, strawberries, raspberries and cherry crops.
- To formally characterize spatial distribution patterns of *Botrytis cinerea* in grapes.
- To compute sampling curves relative to mean mutation incidence estimation.

Methods

- DNA based survey :**
 - Crops: strawberry, raspberry, grape and cherry.
 - Survey conducted in Quebec, Ontario, British Columbia and Nova Scotia.
 - SNPs detected by RFLP-PCR, PNA-PCR or RT-qPCR
 - Azoxystrobin (G143A)
 - Iproposin (H985)
 - H272R, H272Y, H272L, P225F, N293I
- Spatial distribution patterns:**
 - Cluster sampling:
 - 2 vineyards in south western Quebec
 - Spots referenced
 - quadrats sampling (Nr=100)
 - ≈ 10 samples per quadrat
 - Sample analysis:
 - Single nucleotide total DNA extraction
 - H985, H272Y, H272R for *B. cinerea*
 - Spatial distribution pattern:**
 - Fitting discrete probability distribution
 - Binomial distribution (complete randomness)
 - Beta-binomial (aggregation)
- Sampling curve:**
 - Based on the spatial distribution patterns
 - Fixed coefficient of variation (10%, 20% and 30%)

Acknowledgement

The authors want to thank Mathieu Tremblay for his constant support, as well as all the crop advisors, agronomists and researchers from Agriculture and AgriFood Canada, MAFPIQ, OMAFRA and BC Ministry of Agriculture. We would also like to extend a special thanks to the growers for their valuable input, time and use of land. This project was financially supported by Phytodata Inc. and AAFC through the DIAP and PCAA programs.

Preliminary Results

Fig. 1: Mutation incidence in cherries, grape, raspberry and strawberry and fungicide resistance levels in British Columbia, Quebec, Ontario and Nova Scotia.

Fig. 2: Stems required for the computation of sampling curves. A) Bar maps the proportion of mutations in each sampled quadrant. B) Fitting of discrete probability distribution (beta-binomial and binomial distribution) and C) Sampling curves computed for 3 levels of precision.

Table 1: Minimum number of samples required needed for each mutation estimation ($N=2$)

μ	σ	N
0.10	0.10	448
0.05	0.05	164
0.03	0.03	117
0.02	0.02	52
0.01	0.01	25
0.005	0.005	13
0.002	0.002	6
0.001	0.001	3
0.0005	0.0005	2
0.0001	0.0001	1

Table 2: Minimum number of samples required needed for each mutation estimation ($N=3$)

μ	σ	N
0.10	0.10	2448
0.05	0.05	112
0.03	0.03	475
0.02	0.02	239
0.01	0.01	117
0.005	0.005	59
0.002	0.002	26
0.001	0.001	13
0.0005	0.0005	6
0.0001	0.0001	3

Conclusion

Botrytis cinerea has been under the scope of many research projects aiming at the identification of fungicide resistance mechanisms and development of new DNA-based detection tools. This project aimed to provide a large-scale survey of fungicide resistance in cherry, grape, raspberry and strawberry. Our results showed that the level of resistance to thobendazole (G143A) and iproposin (H985) were higher in cherry and grape while resistance to bialosad was similar in the different crops. For all data sets, the beta-binomial distribution was found to fit the data better than the binomial distribution. This indicates local aggregation of fungicide resistance. The beta-binomial distribution supports the estimates of the parameter θ for the beta-binomial distribution ranging from 0.05 to 0.23 with an overall median value of 0.2. Our results confirm aggregated patterns in the spatial distribution patterns of SNPs related to fungicide resistance, which has important implications for determining sample size. The large number of samples required when high precision matters represents a positive limitation toward sampling capacities.

Upcoming research

In this project, resistance to three fungicides groups were investigated in *Botrytis cinerea* populations. The next step pertaining to the assessment of fungicide resistance is to test for resistance to fenpropimorph, fenpropidin and cyproconazole. Thus, the samples collected in this study will also be tested for these three fungicide groups and the results will be available in 2013.

References

Gat, W., R. E. Bauer, et al. (2004). Evolution of an Increasingly Hardened Kinetin in Field Strains of *Botryotinia fuckeliana* in Response to Disinfectant Fungicide Usage. *Physiology* 94(10): 1123-1130.

Van der Heyden, H., Dubé, P., Charron, J.-G., Brisson, L., and Carisse, O. 2013. Combined application of spatial statistics and molecular genetics for identification of specific relationships between pathogenicity related to fungicide resistance in *Botrytis cinerea* populations. *Plant Pathology* under review.

Van der Heyden, H., Dubé, P., Brisson, L., and Carisse, O. 2013. *Strain Scale Spatial Distribution of Single Nucleotide Polymorphisms Related to Fungicide Resistance in *Botryotinia fuckeliana**. *Plant Pathology* under review.

Vekkates, T., M. Larson, M. Hall, S. Karanapudi, 2011. *Detection and Molecular Characterization of Bacillus-Resistant *Botryotinia cinerea* isolates from *Brassica*.* *Plant Dis.* Vol. 95(10): 1382-1390.

Présentation, Colloque en agroenvironnement, novembre 2013

Intégration des techniques de biologie moléculaire, de modélisation et d'analyse spatiale pour le suivi de l'incipit aérien au niveau régional et parcellaire.

Hervé Van der Heyden, Université McGill; PhytoData inc.
Odile Carrière, Agriculture et Agroalimentaire Canada
Luc Brodeur, Consultation agricole LG Inc.



Je me souviens

- PhytoData a été créé en 1992
- Membre de Prisme Consortium (1982)
- Producteurs actionnaires (1996)
- En 2013: PhytoData inc. a réalisé plus de 40 projets
- Par exemple les très médiatisées Mouches Stériles

Mission

- Le Consortium, regroupement de producteurs maraîchers et de professionnels, trouve et apporte des solutions novatrices qui améliorent la compétitivité et la capacité d'innovation des entreprises agricoles, et ce, dans le respect des consommateurs et de l'environnement.

Dépister et quantifier les phytopathogènes

- Dépister et de quantifier les phytopathogènes dès leur apparition, et possible avant l'infection et l'apparition des symptômes, et à toutes les étapes de leur développement;
- pour en contrôler la densité, la dispersion,
- en utilisant les méthodes appropriées de contrôle;
- réduire les pertes de rendement;

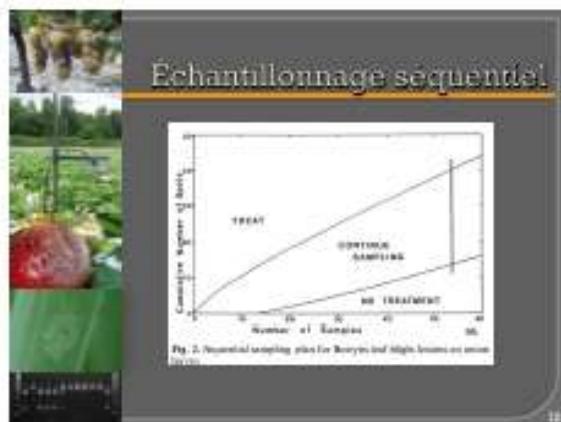
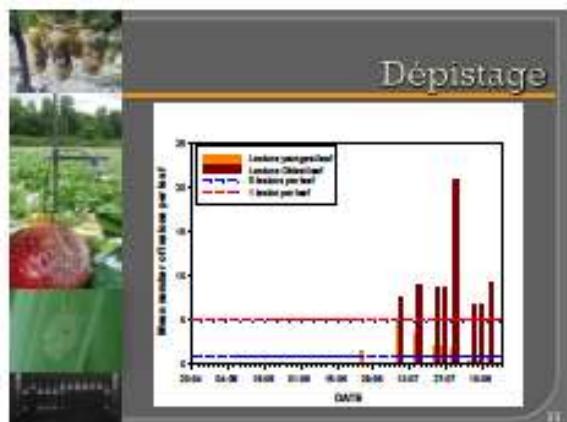
Dépister et quantifier les phytopathogènes

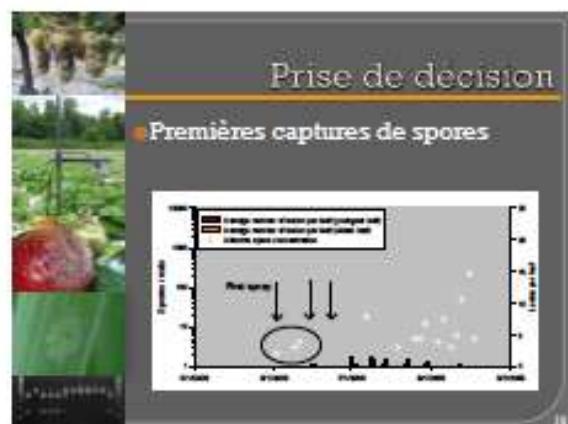
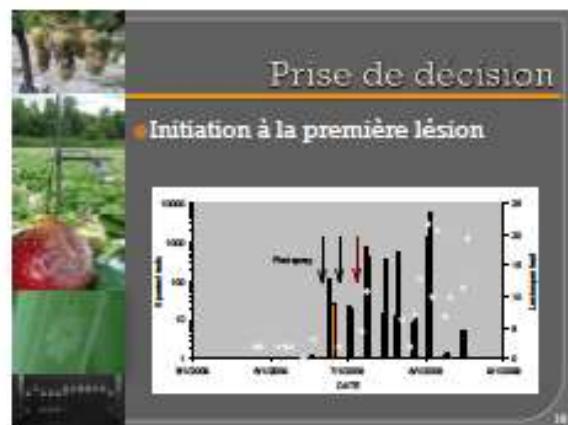
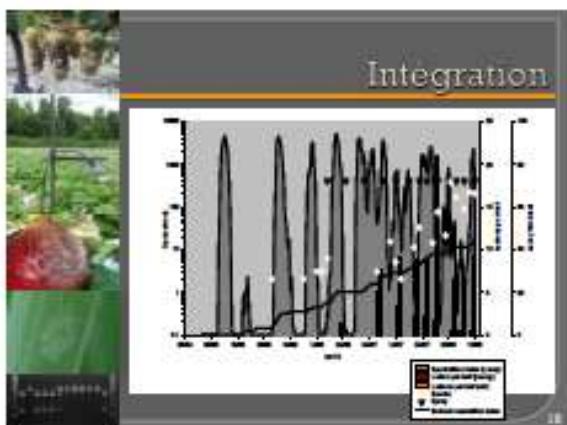
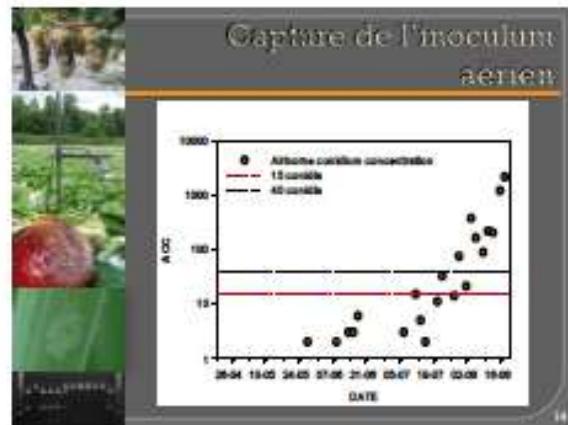
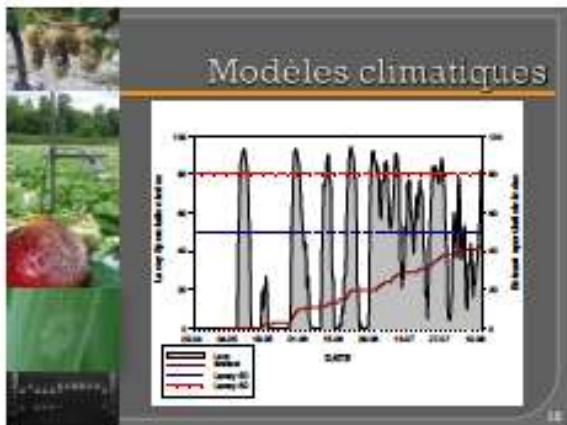
PROBLÈME: sont pas faciles à voir et à identifier en temps réel permettant de répondre aux besoins de la gestion phytosanitaire

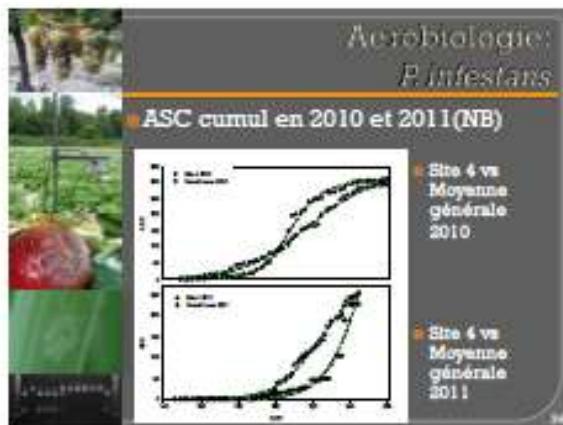
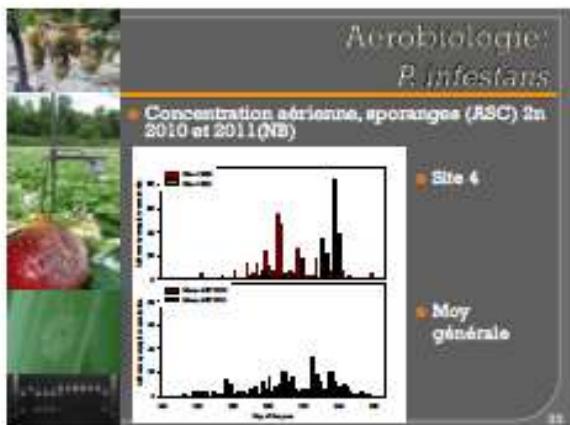
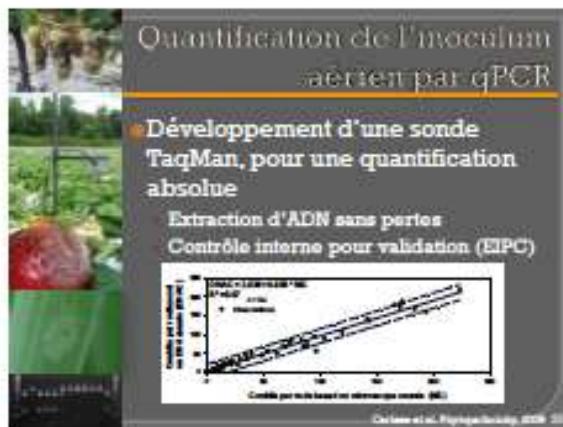
SOLUTION: intégrer la biologie moléculaire aux outils plus traditionnels qui sont le dépistage des symptômes et les modèles prévisionnels de sporulation et d'infection

Se mouler appui au service conseil

- Identification précise;
- Quantification quantitative ou qualitative
- Profil génétique : pathogénécité (races et espèces); résistance; persistance.







Aérobiologie: *P. infestans*

- Variation de l'IAS en fonction du site

Potserville, 2011

IAS

Date d'échantillonage

Fréquence *P. infestans*

- Nouveau Brunswick
3 années sur 4
- Prince-Edward Island
3 années sur 4
- Québec
1 année sur 4

Aérobiologie: *P. infestans*

- Résultats préliminaires: relation entre comptage microscope et comptage PCR (sans optimisation)

R² = 0.99
n = 22

Défis et perspectives

- Collecte des échantillons et temps de réponse
- Nombre d'échantillons requis
- Efficacité d'infection
- Identification des races à partir d'échantillons aériens
- Intégration et modèles de simulation dynamique

Brûture hâtive: Québec 2011

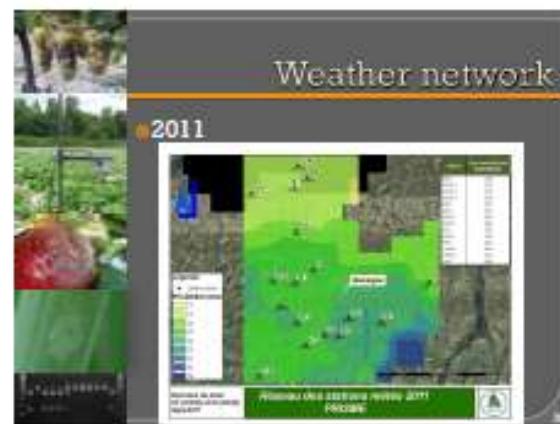
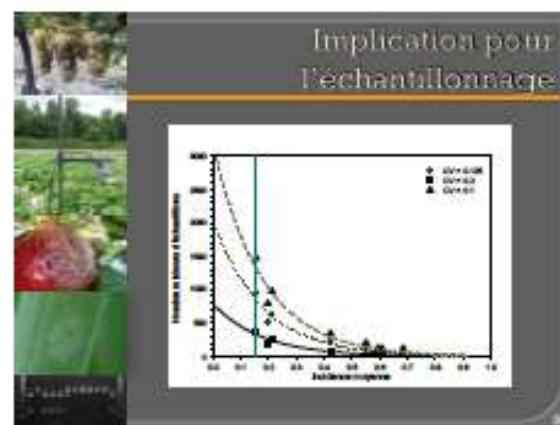
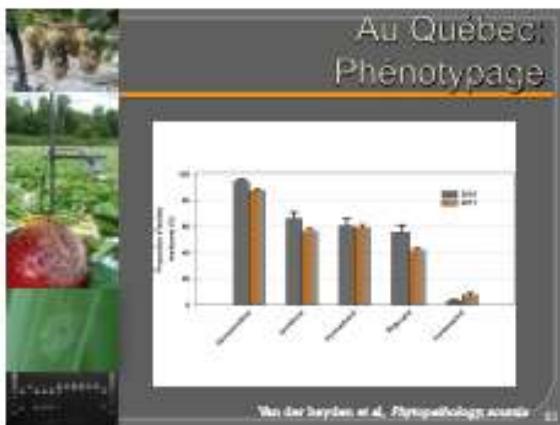
Cumulative severity

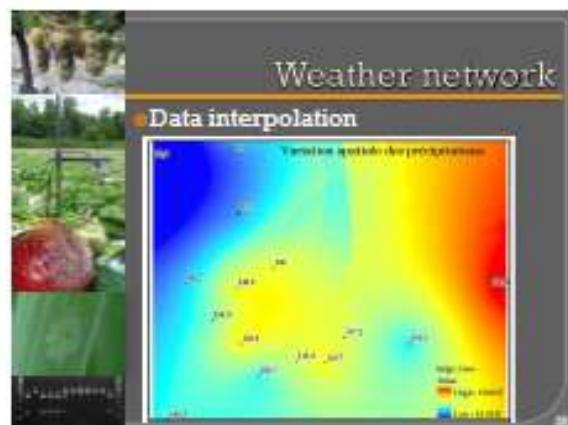
Cumulative SCC

DDT

Résistance aux fongicides

- *Botrytis cinerea*
 - Dicarboxamides (Roval)
 - Strobilurines (Flut, pristine)
 - Bencalide (Lance)
 - Fluopyram (Luna)
 - Penicosamides (Elevate)
- *Botrytis squamosa*
 - Dicarboxamides (Roval)
 - En développement
- *Erysiphe necator* (en développement)
- *Plasmopara viticola* (en développement)
- *Venturia inaequalis* (en développement)
- *Podosphaera aphanis* (en développement)





Présentation, Journée horticoles, décembre 2013

Fongicides contre *Botrytis* : résistance ↗ sous haute surveillance !

Odile Carisse
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Hervé Van der Heyden
Phytodata Inc.

Les pertes causées par les maladies



Options de lutte

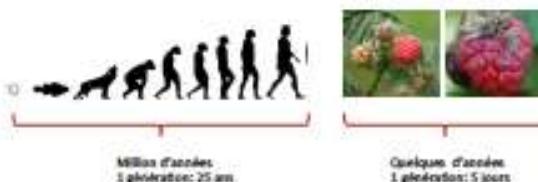
Option	Efficacité	Utilisation	Environnement	Coffre
Synthétique	Moyenne élevée	Facile Compromis (eff; q.;...) Adaptation pathogène	Très faible	0
Culturelle	Moyenne variable (v. individuel)	•+ complexe étroit d'oeuvre	Très faible	SS
Biologique	Variable (v. espèce)	Facile Application Intervalle Résistance	Faible-moyen	SSS
Classique	Facile	Facile Résistance	Moyen élevé	SS

Lutte intégrée!

Les pesticides ont aidé à accroître la productivité de 20 à 50 % au cours des 50 dernières années (FAO stati).

La résistance

Ajustement, naturel et transmissible à la descendance, de la capacité de certains individus d'une population à survivre à un traitement phytosanitaire qui permettrait normalement un contrôle efficace.



Développement de la résistance

Aucun fongicide n'est actif sur tous les champignons : les espèces ou individus peu ou pas sensibles ont une «résistance naturelle».



Développement de la résistance

- Naturellement présente
- Sélection en réponse à l'utilisation d'un fongicide



Développement de la résistance

- Naturellement présente
- Sélection en réponse à l'utilisation d'un fongicide
- Proportion d'individus résistants augmente
- Perte de contrôle



La sélection.....

1. La sélection: les individus résistants sont "sélectionnés" pour survivre et produire une progéniture résistante; l'utilisation répétée d'un fongicide "sélectionne" une population qui devient de moins en moins sensible au fongicide.
2. Changement génétique dans un organisme en réponse à une sélection par les pesticides; pourrait compromettre la lutte en champ.
3. Résistance pratique: un changement de la sensibilité d'une population de champignon pathogène qui se traduit par une perte d'efficacité d'un fongicide à obtenir le niveau de lutte attendu.



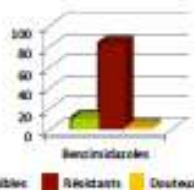
Estimer le risque

	Fongicide	Champignon pathogène			
		Risque	Faible	Moyen	Fort
Sensor	benzimidazoles	Faible 2	3	6	9
Iprodione	dicarboximides				
Cabrio, Rint, Quadris,	phénylamides				
Pristine	Quai				
Pristine, Cetus	carbamates	Moyen 3	2	4	6
Nova	NBS				
Scala, Switch	azolopyrimidines				
Switch	phénylpyrrolones				
	phosphorothiazides				
Thiram, Captan, calore	multi site (dithiocarbamates; Calore, Soutre) Inducteurs résistance naturelle	Faible 1	1	3	3

Table 1: Rhizoctonia, Phytophthora sp.; Moyen (2): Podosphaera aphanis; Fort (3): Botryotinia cinerea, Mycosphaerella fragariae –

Pourquoi se préoccuper de la résistance?

- Nombre limité de familles
- Peu de nouvelles molécules
- Eviter le 'buildup' et les 'super bug'
- Maintenir la vie effective des fongicides
- Réduire les coûts de production
- Réduire les résidus (inutiles)
- Réduire la pollution (inutile)
- Outil efficace en cas d'épidémie grave
- Élément important de la lutte intégrée



Gestion de la résistance

- Le défi est de réduire la pression de sélection tout en conservant le niveau de protection nécessaire.
- Mettre toutes les chances de notre côté:
 - Choix du cultivar
 - Pratiques culturelles (gestion des débris, rotation, densité,...)
 - Réduire l'inoculum et conditions favorables
 - Conditions d'applications (météo, dose, qualité du fongicide,...)
- Effectuer un bon suivi: de la maladie et de la résistance

En pratique

- Réduire le nombre d'applications de fongicides à risque (utiliser quand la population est petite en début de saison)
- Alterner les familles dans le temps et l'espace (?)
- Mélange avec fongicide à faible risque ou de différents groupes selon résistance présente
- Mettre en place un programme sur au moins 5 ans
- Miser sur une culture en santé
- Faire un suivi de la résistance



La résistance aux fongicides C'est l'affaire de tous!



Un groupe de recherche

- PRISME/Phytodata:
■ M. Van Der Heijden
- Agriculture et Agroalimentaire Canada
■ Dr. O. Carter, D.M. Szentgyorgyi, A. Lechowicz, R. Souffriau, M. Gobeil-Richard
- Université McGill et Sherbrooke
■ Drs P. Dubé et J.-B. Charon
- Dr C. Baudoin
- Collaborateurs INRA Versailles et Bordeaux:
■ Drs A.J. Walker et M.F. Costa-Casal

Gobéil, M. and Van der Heijden, M. 2010. Sampling for fungicide resistance. In *Fungicide resistance in plant-pathogen interactions*, Eds. M. Gobéil, M. Van der Heijden, M. T. Léchowicz, and G.A. Weyman. - 2010 Press.

Vandekerkhove, M., Routhier, Bourgoin, L., Léchowicz, G. 2010. Spatial distribution of fungi resistant to fungicides. In *Fungicide resistance in plant-pathogen interactions*, Eds. M. Gobéil, M. Van der Heijden, M. T. Léchowicz, and G.A. Weyman. - 2010 Press.

Gobéil, M., Gagnon, C., Léchowicz, M., Van der Heijden, M., Mihail, J.D. 2010. The emerging challenge of fungicide resistance in grapevines. *Journal of Plant Pathology*.

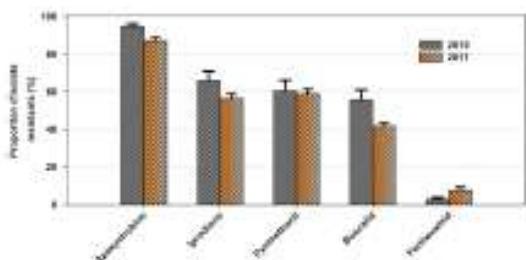
Programme de recherche: phase 1

- Inventaire: phénotypage des souches de *B. cinerea* (2009-2011)
- Développement de tests de détection pour *Botrytis cinerea* (2009-2013)
- Distribution spatiale des gènes de résistance (2009-2012)
- Impact sur l'échantillonnage (2011-2013)
- Inventaire pancanadien: génotypage des souches de *B. cinerea* (2012-2014)

Inventaire: phénotypage des souches de *B. cinerea*

- Moisissure grise dans la vigne
- 2010-2011
- 20 vignobles
- Tests en milieux de culture
- 230 échantillons caractérisés

Inventaire: phénotypage des souches de *B. cinerea* (2010-2011)



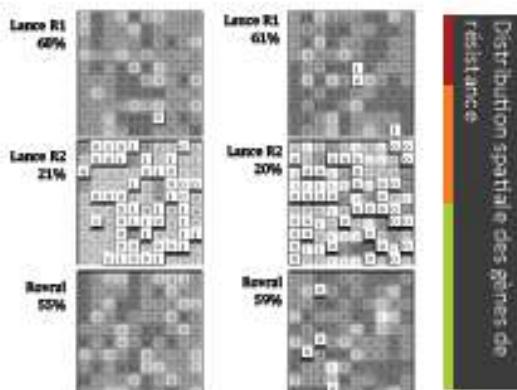
Développement de tests de détection

- *Dicarboximides* (Rovral)
- *Strobilurines* (Flint, pristine)
- *Bascalide* (Lance)
- *Fluopyram* (Luna)
- *Fenhexamides* (Elevate)
- *Fludioxinil et ciprodinil* (Switch)



Distribution spatiale des gènes de résistance

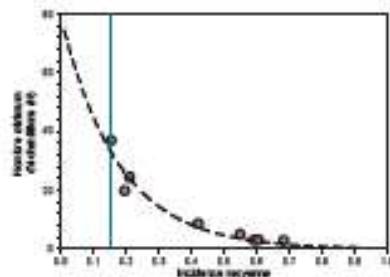
- 2 vignobles échantillonnés
- Chaque site = 1 hectare
- Subdivisé en 100 parcelles
- 10 échantillons par parcelle
- 3 mutations testées



Impact sur l'échantillonnage (2011-2013)

- Distribution aléatoire ou agrégée ?
- Ajustement de modèles statistiques
- Estimation du nombre minimum d'échantillons
- Estimation du nombre de résistants

Impact sur l'échantillonnage

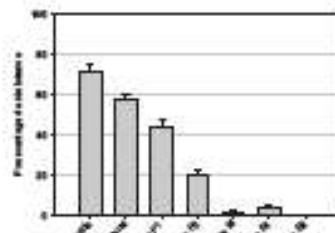


Inventaire pancanadien: génotypage

- Dicarboximides (Rovral)
- Strobilurines (Flint, pristine)
- Boscalide (Lance)
 - Faible 1
 - Faible 2
 - Modérée
 - élevée 1
 - élevée 2



Inventaire pancanadien: génotypage

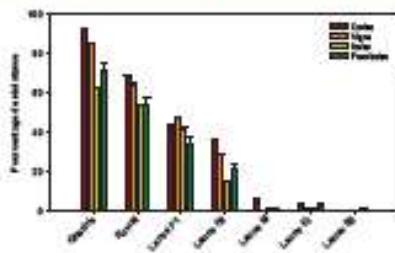


Inventaire pancanadien: génotypage

- Vigne
■ (n = 800)
- Fraises
■ (n = 1000)
- Framboises
■ (n = 800)
- Cerises
■ (n = 250)



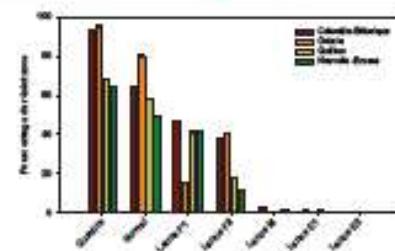
Inventaire pancanadien: génotypage



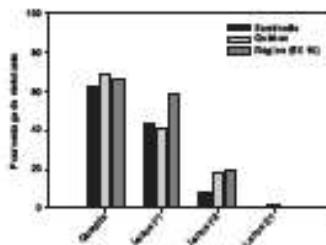
Inventaire pancanadien: génotypage



Inventaire pancanadien: génotypage



Suivi de fermes sentinelles



Programme de recherche: phase 2

- Développer des outils de détection pour les parasites obligatoires
- Développer des outils de détection pour l'échantillonnage des populations
- Déterminer la proportion de résistants au-delà de laquelle une application de fongicide devient inefficace (seuil d'intervention)
- Mesurer l'impact de l'hétérogénéité des pulvérisations

Remerciements

Luc Brodeur
Annie Lefebvre
Mathieu Tremblay
Millie le Gobell-Richard
Mhamoud Larouche Fall
Audrey Levaillant
Marianne Lefebvre
Catherine Thivault
Linda Robarge

Marie-France Chevrelle
Jean-Benoit Charon
Pierre Dutilleul
Wendy Mc Padden Smith
Paul Héleinrand
Gayle Jeppeerson
Sylvia Schubertmann
Gaelle Dubé
Lette Lambert
Fabien Gagné

Tous les conseillers et producteurs qui ont participé au projet et qui n'ont pas été nommés



Article scientifique, soumis Canadian Journal of Plant Pathology, janvier 2014

The changing landscape of fungicide insensitivity in crop pathogens in Canada, 2014.

Bruce D. Gossen¹, Odile Carisse², Larry Kawchuk³, Hervé Van Der Heyden⁴, and Mary Ruth McDonald⁵

¹Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Research Centre, 107 Science Place, Saskatoon, SK S7N 0X2, Canada;

²AAFC, Research Centre, 430 Gouin Boulevard, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC J8B 3E6, Canada;

³AAFC, Lethbridge Research Centre, 5403 - 1 Avenue South Lethbridge, AB T1J 4B1, Canada;

⁴Compagnie de recherche Phytodata Inc., 111 Rang Saint-Patrice, Sherrington, QC, Canada J0L 2N0;

⁵Department of Plant Agriculture, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

Short Title: Fungicide insensitivity of crop pathogens in Canada

Accepted xxxx

Corresponding author: Bruce Gossen Email Bruce.Gossen@agr.gc.ca

ABSTRACT

This review examines how changes in fungicide usage in Canada are increasing the risk of fungicide insensitivity in pathogen populations, using examples from field, vegetable and horticultural crops. The current generation of systemic fungicide is selective, effective, and has a reduced impact on the environment compared to older contact fungicides. However, many of these new fungicides also have an increased risk of fungicide insensitivity. On the Canadian prairies, a trend towards specialization of production within regions has resulted in limited rotations, or even no crop rotation, in many fields, and yield targets are increasing. As a result, the frequency and extent of fungicide usage is increasing rapidly and insensitivity to certain fungicides has been identified in several crop pathogens. Case studies of fungicide insensitivity on *Ascochyta rabiei* on chickpea, *Mycosphaerella pinodes* on field pea, *Fusarium sambucinum* and *Phytophthora infestans* on potato, *Pythium violae*, *P. sulcatum* and other species on carrot, and *Botrytis cinerea* on grapes and berry crops are examined. Fungicide manufacturers have taken action to protect the efficacy of high-risk fungicides by formulating them with other active compounds that have a different mode of action. Also, producers have been advised to rotate fungicides with different modes of action to minimize the risk of insensitivity. Monitoring for fungicide insensitivity is central to early warning of an impending issue with insensitivity, for disease risk prediction, and for avoiding disease control failures. In addition, information on insensitivity at the population level could be used to develop and implement insensitivity management programs.

KeyWords: Fungicides, field crops, vegetable crops, horticultural crops, contact fungicides, systemic fungicides, single-site mode of action

INTRODUCTION

The purpose of this review is to examine how recent changes in fungicide usage in Canada are affecting the development of fungicide insensitivity in pathogen populations. Changes in usage pattern in the extensive production systems of field crops on the Canadian prairies have been particularly rapid in recent years, but examples are drawn from field, vegetable and horticultural crops.

Producers have been managing plant diseases since plants were domesticated. Fungicides were added to the arsenal of management strategies in the 1800s with the introduction of Bordeaux mixture. Insensitivity to fungicides was first detected in the 1970s (benzimidazol). In recent years, an increasing emphasis on food quality has made disease reduction via in-crop application of fungicides an integral component of the production system for many crops in Canada. At the same time, expansion of international trade and travel has increased the frequency of introduction of new plant pathogens / strains into Canada and production areas around the world. Climate change may also be contributing to changes in disease distributions and in the frequency of fungicide application needed to protect a crop in a competitive marketplace. In addition, the importance of plant pathogens and pesticide residues in crops as a barrier to trade is increasing. As a major net exporter of crops, changes that can potentially affect exports are of particular concern to the agricultural industry in Canada.

Contact fungicides such as mancozeb and chlorothalonil, which remain on the exterior of the plant, are generally older chemistries that have activity against a broad spectrum of plant pathogens. Systemic fungicides are taken up by the crop and transported within the plant (to a greater or lesser degree). Systemic fungicides are, with a few exceptions, newer chemistries that have activity against a narrower range of pathogens. Contact fungicides interfere with multiple metabolic pathways in the pathogen, while systemics generally affect a specific site in a specific pathway and so are less toxic to non-target organisms (many are classified as 'reduced risk' pesticides). Contact, broad spectrum fungicides are generally applied at higher rates but are less expensive per application than the newer systemic products. Also, contact fungicides are often less effective because they need to be in place before the pathogen arrives, so any plant tissue that is not thoroughly covered (e.g., a newly emerged leaf) is not protected (Brent & Holloman 2007; Mueller *et al.* 2013). The site-specific mode of action of systemic fungicides has a strong up-side, because their potential for a negative impact on health, safety and the environment is reduced. However, single-site-specific activity can also be an important drawback, because the pathogen may rapidly develop insensitivity to a specific active, or an entire class of actives. How quickly this occurs depends on the pattern of usage and the ability of the pathogen to develop insensitivity without sacrificing pathogenicity (FRAC 2011). There is no evidence of insensitivity to contact fungicides from field studies (Gisi & Sierotzki 2008), which have maintained their efficacy over time (Brent & Holloman 2007).

One example of a class of active compounds with a high risk of pathogen insensitivity is the strobilurin fungicides. Strobilurins bind at the Qo site of cytochrome b in the cytochrome bc₁ enzyme complex (known as Qo inhibitors, or Qols) found in the mitochondrial membranes of fungi (Bartlett *et al.* 2002). The site-specific mode of action of these active compounds increases the potential for insensitivity to develop in pathogen populations (Koller 1991). Many fungal species are reported to have dramatically reduced levels of sensitivity to strobilurin fungicides due to single-amino-acid substitutions in the cytochrome b site (Chin *et al.* 2001; Grasso *et al.* 2006; Pasche *et al.* 2005). Insensitive isolates generally tolerate very high levels of fungicide (Avila-Adame & Koller 2003; Mondal *et al.* 2005; Ypema and Gold 1999), resulting in complete loss of disease control when these fungicides are used as solo products (Gisi *et al.* 2000).

The risk of a pathogen population developing insensitivity to a high-risk fungicide is a cumulative function of several key indicators: i) genetic diversity of the pathogen, ii) potential for rapid production and dispersal of pathogen propagules, and iii) need for repeated application of the fungicide to provide disease management each year (Brent & Holloman 2007). An important indicator of genetic diversity for sensitivity to a particular class of active compounds is if closely related pathogens are insensitive to that class of compounds. Polycyclic pathogens generally produce propagules rapidly, and wind-borne spores ensure rapid dispersal. Production systems with large fields and low diversity (within crop and over time) generally require more frequent application of fungicide than systems

with high diversity. Additional information on these relationships is available at the FRAC website (FRAC 2011).

Fungicide efficacy can be substantially reduced by the development of insensitivity (Brent & Holloman 2007). Since the fungicide still effectively controls sensitive isolates, the frequency of insensitive isolates increases under the selection pressure imposed by each additional application, until the fungicide no longer controls the disease (Ma & Michailides 2005). There are two types of insensitivity: quantitative and qualitative. In quantitative insensitivity, the pathogen becomes less sensitive to each subsequent application of the fungicide, but high rates of fungicide are still effective. In qualitative insensitivity, isolates are almost completely insensitive and control is no longer possible at label rates.

There can be a temptation to blame all instances of disease control failure on loss of fungicide efficacy caused by insensitivity. Factors that could contribute to disease control failure include inappropriate application timing or rate, poor crop coverage, and wrong or deteriorated product. Misidentification of the pathogen / problem can also result in disease control failures that might resemble pathogen insensitivity. For example, repeated use of strobilurin fungicides to prevent early blight of potato (*Solanum tuberosum* L.) caused by *Alternaria solani* Sorauer has contributed to an increase in the prevalence of brown spot disease. Brown spot is caused by *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., which produces similar foliar symptoms to early blight, but is insensitive to strobilurins (Pasche et al. 2003).

There are also instances where disease control failures resulted from increased biological degradation of the active, rather than a change in pathogen sensitivity. For example, enhanced microbial degradation following application of the carboximide fungicides vinclozolin and iprodione to soil resulted in loss of control of soil-borne pathogens such as *Sclerotium cepivorum* (Walker et al. 1986; Mitchell and Cain 1996). Enhanced degradation of metalaxyl has also been identified and related to failure to control cavity spot of carrot (Farrar et al. 2002; Hiltunen & White 2002). Nevertheless, in an increasing number of cases, yield losses are related to fungicide insensitivity (Brent & Hollomon 2007).

Loss of sensitivity to a fungicide has often been assessed based on reduction in mycelium growth or spore germination of the target fungus in the presence of a discriminant dose of the fungicide on solid or liquid media. However, these assessments are slow and time-consuming, and often represent an obstacle to processing large numbers of samples. Insensitivity to fungicide can also be monitored using conventional or real-time PCR to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) that indicate insertion, replacement or deletion of specific nucleic acids that are associated with fungicide insensitivity (Van Der Heyden et al. 2014). Use of these molecular tools has increased sampling capacity and effectiveness, and allowed research to be conducted on populations rather than isolates. Moreover, molecular assays can be used to identify the molecular basis for insensitivity at the SNP level to obtain genotypic patterns of insensitivity. This facilitates study of sub-population dynamics (Ma & Michailides 2005; Van Der Heyden et al. 2014). Information on the frequency of isolates carrying different SNPs in a fungal population is important because the SNPs may differ in terms of their impact of pathogen fitness and level of insensitivity (Billard et al. 2012; Veloukas et al. 2011).

RECENT CHANGES IN FUNGICIDE USAGE

Research into crop diversification in the 1970s and 1980s identified several crops with potential for western Canada. The enthusiastic uptake of these new crops by growers resulted in canola (*Brassica napus* L., *B. rapa* L.) and pulses (field pea *Pisum sativum* L, lentil *Lens culinaris* L., chickpea *Cicer arietinum* L.) becoming important components of the production system on the Canadian prairies, which had previously been dominated by cereals, forages and summer fallow. Diverse cropping rotations, supplemented with genetic disease resistance, became the main mechanism of disease management (Krupinsky et al. 2002), supplemented with occasional application of foliar fungicides (Table 1). The longer intervals between a particular crop that are possible in diverse cropping rotations have

been shown to reduce the impact of many important field crop diseases in Canada (Bailey *et al.* 2000, 2001, Holm *et al.* 2006, Kutcher *et al.* 2013, Peng *et al.* 2014). However, a trend towards specialization of production within regions has resulted in short (or even no) rotation in many areas (Kutcher *et al.* 2013). Also, yield targets have increased following a number of years of high commodity prices, and fungicide usage has increased rapidly in response. From 1996 to 2006, the mean proportion of conventional crop land on the Canadian prairies that received at least one application of foliar fungicide increased from 7% to 11%. However, the proportion of the area treated with a fungicide increased to 23% in 2011, and this proportion is continuing to increase rapidly (T.K. Turkington, personal communication). In contrast, the mean proportion of agricultural land that received an application of foliar fungicide in Ontario increased from 8% in 1996 to 11% in 2006, which reflected a similar pattern to the prairies, but was only 17% in 2011 (Table 1). This indicates that the rapid shift in disease management practice that has occurred in Saskatchewan and Manitoba is not developing as quickly in Ontario.

In vegetable crops, disease pressure has steadily increased as intensive crop production has expanded. Increasing emphasis on quality has made disease management through application of fungicides critical in sustaining growth and delivering a competitive product. As a result, fungicides are applied more frequently to prevent disease. Contact fungicides are often preferred in vegetable crops because they are (usually) less expensive and have a broad spectrum of activity. For some vegetable crops, contact fungicides are the only materials that were registered for use. However, many vegetable crops have a dense crop canopy or other growth habit that reduces access by the contact fungicides, so use a systemic fungicide generally provides more effective disease reduction.

In grape and berry crops, flowers are important sites for infection by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr (Jarvis 1977). After infection; the pathogen can remain quiescent for several weeks. Near harvest, when the sugar content of berries increases, *B. cinerea* can rapidly invade mature fruits causing complete loss of infected berries. As a result, fungicide applications are required during the flowering period and, to a lesser extent, near harvest. An application of fungicide is generally recommended for grapes at the beginning of flowering, 80% cap fall, and at bunch closure, and for berry crops at the beginning of the flowering period (10% bloom), at full bloom (first green berries) and at the end the flowering period. During warm wet seasons, a fourth fungicide application could be required a few days before harvest. Growers are moving from reliance on multi-site fungicides such as chlorothalonil or captan to single-site ones such as iprodione, boscalid, fenhexamid or azoxystrobin. However, this increases the risk of fungicide insensitivity resulting in a disease control failure.

CASE STUDY 1 Fungicide insensitivity in pathogens of pulse crops

Ascochyta blight on chickpea

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is adapted to the driest region of western Canada, offering a high value, drought-tolerant, nitrogen-fixing legume crop for this region (Chongo & Gossen 2001). Ascochyta blight, caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse [teleomorph *Didymella rabiei* (Kovachevski) Arx], is the most important constraint to chickpea production on the Canadian prairies (Gan & McDonald 2002) and around the world (Nene & Reddy 1987). Management of ascochyta blight relies on partial resistance (Ahmed *et al.* 2006), crop rotation and tillage (Gossen & Miller 2004), and application of fungicides (Gan *et al.* 2006; Reddy & Singh 1990).

Strobilurin fungicides were highly effective against ascochyta blight and so were widely and repeatedly used when they first became available for use on chickpea in Canada in 2003. The pathogen was at high risk for developing insensitivity to strobilurins because it reproduces sexually by means of wind-borne ascospores (Armstrong *et al.* 2001), is genetically diverse (Chongo *et al.* 2004), and repeated applications of foliar fungicides are required to provide acceptable disease management each year (Gan *et al.* 2006; Reddy &

Singh 1990). Most importantly, insensitivity to a strobilurin (Qo1) fungicide had already been reported in a related pathogen, *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm (Olaya & Holm 2001; Stevenson *et al.* 2002). Fungicide insensitivity can be dispersed rapidly across large areas via air-borne ascospores (Torianni *et al.* 2008), so the presence of air-borne spores makes the risk of rapid breakdown of disease management a regional issue rather than a local issue.

Insensitivity to Qo1 fungicides in *A. rabiei* was first reported from baseline studies (isolates that were never exposed to Qo1 fungicides) in western Canada in 2004 (Gossen & Anderson 2004) and a rapid shift to insensitivity to Qo1s occurred across large areas of the Northern Great Plains in 2007 (Chang *et al.* 2007; Gossen *et al.* 2008; Wise *et al.* 2008, 2009; Thaher 2011). The life science industry in western Canada was informed immediately that populations of *A. rabiei* in the region were no longer sensitive to Qo1s (Gossen *et al.* 2008, 2009). As a result, one company removed this use from their Qo1 label, and replaced their strobilurin fungicide with a dual-action fungicide for ascochyta blight management across North America. Extension and industry specialists passed the information to retailers and crop advisors in Canada and the northern USA. Most producers across the region changed their fungicide selections in response to this timely warning, and levels of ascochyta blight remained low to moderate in 2007–2012 (Bassendowski & Gossen 2011, 2012).

Mycosphaerella blight on field pea

Mycosphaerella blight, caused by *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vestergr (anamorph *Ascochyta pinodes* (Berk. & Blox.) Junes), is an important foliar disease of field pea in western Canada and around the world (Banniza & Vandenberg 2003; Bretag *et al.* 2006; Davidson & Ramsay 2000). Yield losses in Canada can be as high as 50% (Conner *et al.* 2007). Management of mycosphaerella blight requires repeated fungicide application each year (Beasse *et al.* 2000; Warkentin *et al.* 2000). Qo1 fungicides are widely used because they have excellent efficacy against this pathogen. *Mycosphaerella pinodes* was identified as being at a moderate to high risk of developing insensitivity to Qo1 fungicides because it is genetically diverse (Xue *et al.* 1998), is a polycyclic pathogen with wind-borne spores, and populations of three closely related pathogens, *M. fijiensis*, *M. citri* and *M. graminicola*, are known to be insensitive to Qo1 fungicides (Gisi *et al.* 1997; Grasso *et al.* 2006; Keinath 2009).

Based on this risk assessment, isolates of *M. pinodes* were collected from across the Northern Great Plains and compared to a baseline group with no previous contact with Qo1s. All of the baseline isolates were sensitive to Qo1s. Of the 324 new isolates assessed, all of the isolates collected from the USA were sensitive but 19 isolates from Canada were insensitive. The mean EC₅₀ of the insensitive isolates was 180 mg L⁻¹, corresponding to 65x the label rate (Bowness 2013). Extension specialists and the life science industry in Canada were advised of the potential problem (Bowness *et al.* 2011, 2012). As a result, recommendations have generally changed from single-action Qo1 fungicides to dual-action fungicides, which are less prone to loss of sensitivity. Qo1s are not used as intensively on pea as on chickpea, so a rapid shift to insensitivity is not anticipated.

Other pathogen of concern

Almost all of the research on fungicide insensitivity on field crops on the Canadian prairies has focused on pathogens of pulse crops. There is even an old example of fungicide insensitivity on alfalfa (*Medicago sativum* L.) grown for seed (Gossen *et al.* 2001). Pulse crops represent a relatively small component of the production area in the region, even though they are grown on millions of hectares each year. Canola has become the largest crop in the region, surpassing wheat. The level of fungicide insensitivity in important, high-risk pathogens of these large-acreage crops, especially *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces. & De Not. (blackleg) on canola and *Fusarium graminearum* Schwabe, (teleomorph

Gibberella zeae (Schw.) Petch) (fusarium head blight) of wheat, is not known. The rapid rate of increase in fungicide usage on field crops in the region indicates that insensitivity will quickly become an issue in these pathogens, if indeed it is not already resulting in losses in disease control.

CASE STUDY 2. Fungicide insensitivity in pathogens of potato

Fusarium dry rot

Fungicide insensitivity is not a new issue to disease management in potato crops. For example, treatment of seed pieces with thiophanate-methyl (TPM) fungicide and pre-storage applications of thiabendazole (TBZ) fungicide initially provided effective reduction in silver scurf caused by *Helminthosporium solani* Durieu & Mont. However, these fungicides were quickly rendered ineffective by fungicide insensitivity (Kawchuk *et al.* 1993).

Dry rot of potato tubers associated with infection by specific *Fusarium* spp. can cause severe quality and yield losses across the major potato production areas in Canada. One of the pathogens causing dry rot, *F. sambucinum* Fuckel (teleomorph *Gibberella pulicaris*), produces trichothecene mycotoxins as well as reducing plant yield and tuber quality (Kawchuk *et al.* 2002). Management of dry rot has involved the use of the benzimidazole fungicides (TBZ) as a post-harvest treatment and TPM as a seed treatment (Holley & Kawchuk 1996). This is a very similar pattern of use that had previously resulted in development of insensitivity to silver scurf caused by *H. solani*.

Benzimidazoles bind to the tubulin molecule to inhibit microtubule assembly and cell division. Although TPM does not belong structurally to the benzimidazoles, it acts via the alkyl benzimidazole carbamate, carbendazim. Insensitivity often occurs between actives, such as TBZ and carbendazim, which have related structures and a similar mechanism of action. Insensitivity to TBZ has been reported in *F. sambucinum*, but is rare in other *Fusarium* spp. on potato (Kawchuk *et al.* 1993). The EC₅₀ values for benzimidazole insensitive isolates of *F. sambucinum* in Canada ranged between 34 to 71 mg L⁻¹ for TBZ and greater than 2500 mg L⁻¹ for TPM.

Pathogen insensitivity to the benzimidazoles in potato production was initially observed as a result of substantial increases in the incidence of dry rot and the loss of entire potato storages (Kawchuk *et al.* 1993). Since *F. sambucinum* is the dominant pathogen causing potato dry rot in Canada, the insensitivity caused catastrophic crop losses in all major potato growing areas (Holley & Kawchuk 1996). Production practices were quickly changed to avoid the use of TPM seed treatments because alternatives were readily available. Also, the use of TBZ as a postharvest treatment was reduced to only the most badly bruised tubers that were to be stored for more than several months. Application of postharvest TBZ was also only recommended for farms experiencing dry rot caused by sensitive *F. sambucinum* or other *Fusarium* species.

To characterize the benzimidazole insensitivity in *F. sambucinum*, homokaryons were derived from single ascospores that were produced *in vitro* from crosses of TBZ-insensitive with sensitive isolates. The β-tubulin gene was amplified from these homokaryons using degenerate oligonucleotides synthesized to conserved sequences of the β-tubulin gene derived from related fungi. An open reading frame containing three putative introns and a deduced amino acid sequence of 446 amino acids exhibited a high level of homology to the β-tubulin gene of other fungi. Although nucleotide and amino acid differences were observed in the β-tubulin gene, none were linked to TBZ insensitivity (Kawchuk *et al.* 2002). Linkage analysis confirmed that unlike many other plant pathogens, the isolated β-tubulin gene is single copy and was not linked to TBZ insensitivity in *F. sambucinum*. The mechanism of benzimidazole insensitivity in *F. sambucinum* remains unknown, but insensitivity does not appear to negatively affect the pathogen.

Insensitivity to TBZ is expected to persist in the *F. sambucinum* population even after application of TBZ was discontinued, because of similar growth rates and pathogenicity of insensitive and sensitive isolates. Current management recommendations are that fungicides with different modes of action should be applied in succession to avoid prolonged exposure to a single active ingredient. Also, these fungicides need to be combined with a contact fungicide whenever possible, including the new alternative systemic fungicides. Management of dry rot has been forced to rely less on fungicide application to reduce disease levels until alternatives are available. Instead, management focuses on production and storage practices that minimize the incidence of dry rot, such as preventing tuber damage which is required for infection by *Fusarium* spp. (Lynch et al. 2003).

Late blight

Late blight caused by *Phytophthora infestans* Mont. (de Bary) is an important disease of potato worldwide, and can also infect tomato (*Lycopersicon esculentum* Mil) and other members of the Solanaceae. Repeated fungicide application over the growing season is required to reduce losses, but worldwide annual losses are still estimated to be in the billions of dollars (Kawchuk et al. 2014).

Genotypes of *P. infestans* have shown a propensity for developing insensitivity to certain site-specific fungicides (Kalischuk et al. 2012, Hu et al. 2012, Wijekoon et al. 2013). Prior to 1993, the phenylamide fungicide mefenoxam (the R-enantiomer of metalaxyl) was effective against late blight. Mefenoxam inhibits sporulation and mycelium growth inside the host tissues by inhibiting RNA polymearase-1, so mutations that change the affinity of this enzyme could result in insensitivity to this fungicide (Davidse et al. 1983). In 1993, the mefenoxam-insensitive genotypes US-7 and US-8 displaced the sensitive isolates (Goodwin et al. 1998) and US-8 has continued to predominate in many production areas.

The genotypes US-8 and US-20 have consistently been insensitive to mefenoxam, while genotypes US-22, US-23 and US-24 were initially highly sensitive to mefenoxam. However, recent studies have demonstrated a wide range of mefenoxam insensitivity among these previously sensitive genotypes (Kalischuk et al. 2012; Hu et al. 2012; Wijekoon et al. 2013). The development of genotypes insensitive to mefenoxam has resulted in severe epidemics of late blight in Canada and the United States, due in large part to fungicide insensitivity and long-distance movement of *P. infestans* on infected plant material (Hu et al. 2012; Kalischuk et al. 2012; Fry et al. 2013; Wijekoon et al. 2013).

Many new systemic fungicides with activity against late blight have been identified. Fungicides with different mode of action are being used in rotation with, and co-applied with contact fungicides such as chlorothalonil or mancozeb. Use of mefenoxam has been reduced, and co-application of mefenoxam with a contact fungicide has become a standard practice. This change in usage pattern has lowered the selection pressure favouring insensitive strains and slowed the development of insensitivity, and has been associated with the recurrence of mefenoxam-sensitive strains (Grünwald & Flier 2005).

A new generation of fungicides that have a lower potential impact on the environment, such as the phosphites, are promising systemic fungicide that may be part of integrated crop management strategy for late blight (Lobato et al. 2008). It has been shown that certain chemical compounds, such as phosphites, have the ability to stimulate plant defense responses and are also active against oomycetes *in vivo*. These observations have had significant practical implications for late blight management at a time when fungicide insensitivity in *P. infestans* is rapidly increasing (Peters et al. 2014).

CASE STUDY 3: Fungicide insensitivity in cavity spot on carrot

Cavity spot of carrots is an important root disease of carrot in many parts of the world. The disease is characterized by superficial, elliptical brown lesions on the surface of the root, which may also be associated with vertical cracks. The presence of more than two or three

small lesions makes the carrot crop visually unacceptable for the fresh market. The lesions are also a problem on processing carrots because they are not easily removed in the peeling process.

Cavity spot is a disease complex caused by several species of *Pythium*. Worldwide, *P. violae* Chesters and Hickman and *P. sulcatum* Pratt and Mitchell are the most common species, but *P. sylvaticum* Campbell and & Hendrix and several others are also commonly isolated (Hiltunen & White 2002). Identification of the pathogen spp. associated with cavity spot in a region is important because species differ in host range and also vary in sensitivity to metalaxyl fungicide (Hiltunen & White 2002). For example, *P. sulcatum* was less susceptible to metalaxyl than *P. violae* (White et al. 1988). In Ontario, *P. sulcatum*, *P. irregulare*, *P. violae* and *P. ultimum* are the species most commonly isolated from cavity spot lesions (McDonald 1994; M. Tesfaendrias personal communication). In Quebec, *P. sulcatum* and *P. sylvaticum* are most common, but *P. macrosporum* Vaartaja & van der Plaats-Niterink and several other species are also associated with the disease (Allain-Boule et al. 2004).

The recommended cultural practices for management of cavity spot include avoiding highly infested fields and selecting carrot cultivars that are less susceptible to the disease. Most commercial cultivars are susceptible (Lu et al. 2012; Saude et al. 2014) and crop rotation is generally not effective (Hiltunen & White 2002, Lu et al. 2012). Application of the fungicide metalaxyl or its R-enantiomer, mefenoxam, is the standard practice for managing cavity spot. The fungicide is applied at seeding or early in the growing season in Canada, but timing of application varies in different regions of the world (Hiltunen & White 2002). For example, the fungicide is applied up to three times during the growing season in California (Farrar et al. 2002).

There have been many reports of partial or complete failure of metalaxyl to control cavity spot. Some failures resulted from reduced persistence of the fungicide caused by enhanced microbial degradation in soil. For example, enhanced degradation of metalaxyl was identified in a soil that had been treated with metalaxyl six times over 14 years (Hiltunen & White 2002). Similar results were found in California, where rapid degradation of mefenoxam occurred in fields that had received repeated applications of the fungicide compared to fields where no fungicide had been applied (Farrar et al. 2002). It is important to note that, in these instances, the pathogen population remained sensitive to metalaxyl, so the breakdown in disease management was not related to insensitivity to the fungicide. Instead, the active compound was degraded so rapidly in soil that it was no longer effective at normal rates of application.

Another source of failure in disease management may be that metalaxyl/ mefenoxam is not effective against the *Pythium* spp. that predominates at the site. In the U.K. for example, *P. sulcatum* was found to be less sensitive to metalaxyl than *P. violae*. A preplant soil test was developed to allow growers to determine which *Pythium* species was present in a field and hence the risk of cavity spot (Hiltunen and White 2002). Also, *Pythium* isolates from diseased carrots in Michigan and California were evaluated for sensitivity to mefenoxam and two other fungicides with activity against Oomycetes, zoxamide and fluopicolide. For the new fungicides zoxamide and fluopicolide, which had not yet been registered for use on carrots, lack of activity against an isolate would be a characteristic of the species, rather than the result of development of insensitivity from selection pressure, because the pathogen populations had not been exposed to these actives. All of the species were sensitive to zoxamide, most were sensitive to mefenoxam, and each isolate of *P. ultimum*, *P. sylvaticum* and *P. violae* was sensitive to fluopicolide, but isolates of *P. dissoticum*, *P. irregulare* and *P. sulcatum* were not sensitive to fluopicolide (Lu et al. 2012). When isolates of *P. sulcatum*, *P. sylvaticum* and *P. macrosporum* from Quebec were evaluated for sensitivity to metalaxyl and zoxamide, each isolate was sensitive to both fungicides, but isolates of *P. macrosporum* showed a wide variation in sensitivity to zoxamide (Martinez et al. 2005). This indicates that a fungicide might be highly effective at one site, but much less

effective at another site, based on differences in the species that are dominant at the sites. Also, species that are not sensitive to a fungicide would be expected to proliferate in a particular field or region with repeated application of that fungicide. However, the complex interactions that affect resource utilization and microbial ecology in soil may act as a counter-balance to this selection pressure, ensuring that the proportions of pathogenic *Pythium* spp. at a site change slowly in many situations.

Fungicide insensitivity may also cause failures in control of cavity spot. In the study of isolates from Michigan and California, few isolates of *P. irregularare* were highly insensitive to mefanoxam and some isolates of *P. intermedium* and *P. sylvaticum* had intermediate insensitivity. One of 116 isolates of *P. violae* had intermediate insensitivity to mefanoxam (Lu *et al.* 2012). However, an extensive study in England found no *P. violate* isolates that were insensitivity to metalaxyl (Hiltunen & White 2002).

Failure of metalaxyl/ mefanoxam to control cavity spot of carrot has been reported from many areas. However, in California, England, and possibly other regions, the pathogens in the disease complex remained sensitive to metalaxyl, and enhanced degradation in the soil was identified as the cause of the control failures (Fararr *et al.* 2002; Hiltunen & White 2002). We conclude that enhanced degradation may be a major cause of disease control failures for these products.

Several authors have noted the need for alternatives to metalaxyl to protect carrots from cavity spot (Hultunen & White 2002; Martinez *et al.* 2005; Lu *et al.* 2012). The report that several *Pythium* species isolated from carrots in the United States were insensitive to fluopicolide, which is not yet registered for this use, represents a concern because it indicates that the efficacy of this fungicide may not be durable. There is also evidence that repeated exposure to zoximide (also not registered on carrots) can select for insensitivity in some *Pythium* spp. When isolates were grown on media amended with zoxamide and transferred 11 times, three isolates of *P. sulatum* developed some insensitivity and one isolate of *P. sylvaticum* developed a high level of insensitivity ($> 900x$) (Martinez *et al.* 2005). Interestingly, zoxamide effectively reduced cavity spot in an inoculated greenhouse trial with carrots grown in soil-less mix, but metalaxyl had no effect (Martinez *et al.* 2005). This lack of activity of metalaxyl was not related to insensitivity or enhanced degradation, and raised questions about other factors that affect efficacy, such as the fungicide binding to the organic matter in the peat-based growing medium (Martinez *et al.* 2005).

Currently, none of the genes associated with fungicide sensitivity in *Pythium* spp. have been identified and there is no information about how insensitivity affects pathogenic fitness. Thus, cultural methods for management of cavity spot, such as use of resistant cultivars, should be practiced where available. Also, banding of the fungicide over the row, to treat only a portion of the entire field, may reduce the rate of development of both fungicide insensitivity and enhanced degradation. Biological controls or products that enhance host resistance could also play a role in protecting carrots from cavity spot, but there has been no progress in these approaches to date.

CASE STUDY 4: Fungicide insensitivity in *Botrytis cinerea* on grapes and berry crops

Fungicides that specifically target *Botrytis* spp. make up 10% of the world market in fungicide, with application to wine and table grapes representing 50% of this market segment (Dean *et al.* 2012). In Canada, both multi-site inhibitors and single-site fungicides are registered for management of botrytis diseases in stone fruits, grapes and berry crops. Multi-site inhibitors such as chlorothalonil and dithiocarbamate generally act by blocking enzymes related to respiration (Leroux *et al.* 2010). They are only effective if applied prior to infection (Van der Heyden *et al.* 2012). The single-site fungicides have a broader window of efficacy but have a moderate to high risk of development of insensitivity. Strobilurins and carboxamides affect mitochondrial respiration by inhibiting the activity of mitochondrial complex III and II, respectively (Leroux *et al.* 2010). Dicarboximides affect osmoregulation by inducing lipid peroxidation, membrane destruction and over-production

of reactive oxygen species. Sterol biosynthesis inhibitors affect C-4 demethylation during ergosterol biosynthesis (Leroux *et al.* 2010).

For the most part, information about fungicide insensitivity is acquired through surveys conducted at various spatial scales (farm, region, province or country). As for any types of surveys, the precision of fungicide insensitivity estimation increase with increasing number of samples collected (Van Der Heyden *et al.* 2014).

Inventory of phenotypic insensitivity.

In 2010 and 2011, a total of 230 samples were collected in 18 vineyards located in the province of Québec. Spores from 10 infected berries were collected from each vineyard. Each berry was selected because it carried a single sporulating colony of *B. cinerea*, and the spores were collected using individual dry BD-BBL culture swabs (Fisher Scientific, Withby, ON). For each fungicide (azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, boscalid, fenhexamid), a discriminant dose was added to the media following Leroux *et al.* (2010). The assays were conducted on 1.3% agar media, except for boscalid where the assays were conducted on PS media (agar plus 4 g of sodium succinate, 2 g of K₂HPO₄, and 2 g of KH₂PO₄). For each sample, 0.3 mL of a spore suspension was spread over the surface of agar medium and incubated at 19° C in the dark for 24 h. The proportion of germinated spores was calculated based on assessment of 100–200 spores per treatment. Only spores with a germ tube at least twice the average length of non-germinated spores were considered germinated.

The incidence of fungicide insensitivity was relatively constant over the two years (Fig. 3). When calculated across years, 91% of isolates were insensitive to azoxystrobin, 61% to iprodione, 60% to pyrimethanil, 49% to boscalid and 5% to fenhexamid. The most important result was that the level of fungicide insensitivity in *B. cinerea* isolates in Québec vineyards was > 40% for most of the fungicides tested. Despite the high level of insensitivity identified in these studies, the relationship between insensitivity in isolates and breakdown of disease management in the field is not clear. Research to identify thresholds for disease control failures is needed.

Inventory of genotypic insensitivity.

Isolates of *B. cinerea* were collected from vineyards and berry fields in Nova Scotia, Québec, Ontario and British Columbia in 2012 as described previously. Each swab was used to inoculate solid media amended with novobiocin (100 µg mL⁻¹) and tetracycline (50 µg mL⁻¹) for purification and conservation. DNA extraction was performed using a commercial isolation kit (MP Biomedicals, Solon, OH). Isolates that were insensitive to the fungicides assessed in the phenotypic screening were identified with RFLP-PCR and PIRA-PCR assays using published primers (Veloukas *et al.* 2011). The detection of mutation F412wt-I-SV related to fenhexamid insensitivity was performed using an ASPPAA assay (Billard *et al.* 2012).

The result of the genotypic survey was similar to that from the phenotypic assessments. The frequency of isolates carrying mutations related to fungicide insensitivity of 82% to azoxystrobin (mutation G143A), 83% to iprodione (I86S), 80% to boscalid (H272R, H272Y, H272L, N230I, P225F), and 3% to fenhexamid (F412I, F412S, F412V) (Fig. 4).

Overall, the proportion of *B. cinerea* isolates carrying genetic mutations related to fungicide insensitivity was 71% to azoxystrobin, 57% to iprodione, 44% to boscalid mutation H272R, 20% to boscalid H272Y, 1% to boscalid N230I, 3% to boscalid H272L, and 0.1% to boscalid P225F, and 4% for fenhexamid (Fig. 5). The pattern of insensitivity was generally similar among the provinces, except that the proportion of isolates carrying mutation G143A for azoxystrobin was higher in British Columbia and Ontario (94%) than in Quebec and Nova Scotia (66%) and the proportion of isolates carrying mutation I86S for iprodione was higher in Ontario (80%) than in the other provinces (49%–64%). This

pattern was similar across the four crops surveyed (cherry, grape, strawberry and raspberry), with a higher proportion of insensitivity in cherry and grapes (Figure 5).

Recent developments in molecular detection of fungicide insensitivity have enhanced the surveillance and monitoring capacities of researchers and crop advisors. Estimates of insensitivity levels provided by classical phenotypic assays were generally similar to those obtained with PCR-based assays of specific SNPs in *B. cinerea*. The benefit of using molecular tools to test for fungicide insensitivity is not only to provide insight on the specificity of a polymorphism towards a particular insensitivity phenotype, but also to a more precise characterization in terms of fitness and the practical implications of insensitivity. For example, each of the five known SNPs for insensitivity to boscalid were found in each province. Mutation H272R was by far the most frequent (44% of isolates), followed by H272Y (20%), and the other three at low frequency. The value of the insensitivity factor associated with the two dominant SNPs is low to intermediate, while the other SNPs confer a much higher degree of insensitivity (Veloukas *et al.* 2011; Yin *et al.* 2011). Field insensitivity is influenced by the proportion of insensitive individuals carrying SNPs associated with a low, intermediate or high insensitivity factor, so the proportion of specific SNPs in the population has a very important practical significance for field insensitivity. Interpreting the results of insensitivity assays based on the frequency of each SNP may lead to a more accurate estimation of the potential impact of this insensitivity on practical disease management.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In this review, insensitivity to fungicides was shown to be an important issue in crop production across Canada. Also, the need for management of insensitivity via alternatives to fungicide application, rotating or tank mixing products with different modes of action, and monitoring pathogen populations for insensitivity was a consistent factor across crop types and regions.

Case study 1 demonstrated that fungicide usage is increasing rapidly in response to widespread use of short rotations and high yield targets for field crops on the Canadian prairies. This represents a very substantial change in the production system in this region. Also, many of the newer single-site of action fungicides have a moderate to high risk of fungicide insensitivity, unlike the older contact active compounds where there is a very low risk of insensitivity. As a result of increased usage and increased risk, insensitivity to certain fungicides has already been identified in several pathogen populations and other fungicides are at risk. Manufacturers have moved to protect the efficacy of several high-risk fungicides by formulating them together with other active compounds with a different mode of action. Another approach is for producers to rotate fungicides with different modes of action to minimize the risk of development of insensitivity.

Minimizing the need for fungicide application through crop rotation, utilization of genetic resistance and use of agronomic packages that optimize crop growth will also reduce the risk of fungicide insensitivity. However, monitoring for insensitivity is crucial to identifying the onset of insensitivity, its distribution and evolution, and to identify factors that influence insensitivity. As such, monitoring is an essential first step in the design and implementation of management strategies to minimize insensitivity.

Case study 2 described situations that represent the status quo for fungicide sensitivity of vegetable crops in Canada. Fungicide usage is high in many vegetable crops, where visual quality is a critical component in a competitive market. These are crops where producers are aware that the normal patterns of fungicide usage can result in development of fungicide insensitivity, and new fungicides are routinely being sought to replace classes of fungicides when their efficacy is lost to insensitivity. For most vegetable crops, rotation of fungicides together with crop rotation generally provides effective disease management, without the need for rapid response to changes in pathogen insensitivity within a growing season. In Case study 3, many of the reported instances of breakdown in disease

management are likely caused by incorrect identification of the causal agent and / or enhanced degradation of the active compound. However, insensitivity also contributed to management failures in some situations, and rotation of fungicides with different modes of action is currently not an option. Cavity spot on carrot appears to be a system where use of molecular tools for rapid identification of the pathogen(s) at a site, combined with assessment of the presence of mutations for insensitivity, could be used to reduce the risk of management failures.

Case study 4 of fungicide insensitivity in vineyards and berry crops represents a situation where insensitivity has developed against many of the most common fungicides, and molecular assessments are being used to make disease management using fungicides possible. A very high proportion of the production area receives repeated application of fungicide throughout the growing season, and there is no opportunity to use crop rotation to reduce disease pressure on the crop. Also, the time taken for insensitivity to develop after the introduction of a new fungicide has decreased (Brent & Hollomon 2007). As a result, fungicide insensitivity is an important issue in these crops. Information about the status of fungicide insensitivity is used for fungicide selection and to assess the need to implement insensitivity management strategies. As a result, researchers and crop advisors are focusing on techniques to screen for fungicide insensitivity in real time, to provide producers with recommendations for selecting effective fungicides for their situation and on how best to manage insensitivity.

Management of fungicide insensitivity is important for growers and agribusiness because it affects yield, stability of production, and economic sustainability. Information on the level of insensitivity is essential for making informed disease-management decisions. Management of fungicide insensitivity is also indirectly important to consumers because it can affect quality and product availability. Fungicide insensitivity has been an important issue for agriculture in Canada for many years, but its importance is increasing as fungicide usage becomes the norm in field crops, as it is already for vegetable and horticultural crops. Monitoring high-risk pathogens of field crops to identify the development of insensitivity is clearly required, before this change in production practice results in large-scale breakdown of disease control.

Acknowledgements

The authors of case study 4 would like to thank the crop specialists in Québec, Nova-Scotia, Ontario and British Columbia. A portion of project funding was provided by the sector councils of Quebec, British Columbia, Nova Scotia and Ontario, who administer the Canadian Agricultural Adaptation Program (CAAP) for Agriculture and Agri-Food Canada. The authors would like to acknowledge in particular Dr. Wendy McFadden-Smith, Dr. Gayle Jerperson, Dr. Paul Hildebrand, Dr. Siva Sabaratnam and Miss Liette Lambert for their great collaboration.

REFERENCES

- Ahmed HU, Chang KF, Hwang SF, Gossen BD, Howard RJ, Warkentin TD. 2006. Components of disease resistance in desi and kabuli chickpea varieties against ascochyta blight. *Plant Pathol J* 5:336–342.
- Allain-Boule N, Levesque CA, Martinez C, Belanger RR, Tweedell RJ. 2004. Identification of *Pythium* species associated with cavity-spot lesions on carrots in Quebec. *Can J Plant Pathol.* 26:365–370.
- Armstrong CL, Chongo G, Gossen BD, Duczek LJ. 2001. Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Can J Plant Pathol.* 23:110–113.
- Avila-Adame C, Koller W. 2003. Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. *Pest Manage Sci.* 59:303–309.
- Bailey KL, Johnston AM, Kucher HR, Gossen BD, Morrall RAA. 2000. Managing crop losses from foliar diseases with fungicides, rotation, and tillage in the Saskatchewan Parkland. *Can J Plant Sci.* 80:169–175.
- Bailey KL, Gossen BD, Lafond GP, Watson PR, Derksen DA. 2001. Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991–1998: Univariate and multivariate analyses. *Can J Plant Sci.* 81:789–803.
- Banniza S, Vandenberg A. 2003a. The influence of plant injury on development of *Mycosphaerella pinodes* in field pea. *Can J Plant Pathol.* 25:304–311.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manage Sci.* 58:649–662.
- Bassendowski KA, Gossen BD. 2011. Ascochyta blight on chickpea in Saskatchewan, 2009 and 2010. *Can Plant Dis Surv.* 91:127.
- Bassendowski KA, Gossen BD. 2012. Ascochyta blight on chickpea in Saskatchewan, 2011. *Can. Plant Dis. Surv.* 92:133.
- Beasse C, Ney B, Tivoli B. 2000. A simple model of pea (*Pisum sativum*) growth affected by *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Pathol.* 49:187–200.
- Billard A, Laval V, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Beffa R, Debieu D. 2012. The allele-specific probe and primer amplification assay, a new real-time PCR method for fine quantification of single-nucleotide polymorphisms in pooled DNA. *Appl Environ Microbiol.* 78:1063–1068.
- Bowness R, Chang KF, Gossen BD, Goswami RS, Hwang SF, Willenborg C, Strelkov SE. 2011. Initial insensitivity response of *Mycosphaerella pinodes* isolates to pyraclostrobin fungicide. pg. 19 in Proc. Plant Pathol. Soc. Alberta, November 7–9, 2011, Edmonton, AB.
- Bowness R, Chang KF, Gossen BD, Goswami RS, Hwang SF, Willenborg C, Strelkov SE. 2012. Insensitivity to pyraclostrobin fungicide in *Mycosphaerella pinodes* on the Northern Great Plains. Proc. Can. Pulse Res. Workshop, Niagara Falls, Nov. 6–9, 2012. p. 30.
- Bowness R. 2013. Sensitivity of *Mycosphaerella pinodes* to pyraclostrobin and optimizing fungicide application in field pea [dissertation]. University of Alberta, Edmonton, AB.
- Brent KJ, Hollomon DW. 2007. Fungicide Resistance: The Assessment of Risk. [Online]. Fungicide Resistance Action Committee, Monograph 2, Global Crop Protection Federation. Available from: <http://www.frac.info/frac/index.htm>.
- Bretag TW, Keane PJ, Price TV. 2006. The epidemiology of ascochyta blight in field peas: A review. *Austr J Agric Res.* 57:883–902.
- Chang KF, Ahmed HU, Hwang SF, Gossen BD, Strelkov SE, Blade SF, Turnbull GD. 2007. Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* to chlorothalonil, mancozeb, and pyraclostrobin fungicides, and effects of strobilurin fungicides on the progress of ascochyta blight of chickpea. *Can J Plant Sci.* 87:937–944.
- Chin KM, Chavaillaz D, Kaesbohrer M, Staub T, Felsenstein FG. 2001. Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* to strobilurins. *Crop Prot.* 20:87–96.

- Chongo G, Gossen BD. 2001. Effect of plant age on resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea. *Can. J Plant Pathol.* 23:358–363.
- Chongo G, Gossen BD, Buchwaldt L, Adhikari T, Rimmer SR. 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Dis.* 88:4–10.
- Conner RL, Hwang SF, Woods SM, Chang KF, Bing DJ, Dongfang Y, Su H, McAndrew DW, Yager LM. 2007. Influence of agronomic traits on the expression of tissue-specific resistance to mycosphaerella blight in field pea. *Can J Plant Sci.* 87:157–165.
- Davidse LC, Hofman AE, Velthuis GCM. 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Exp Mycol.* 7:344–361.
- Davidson JA, Ramsey MD. 2000. Pea yield decline syndrome in South Australia: the role of diseases and the impact of agronomic practices. *Austr J Agric Res.* 51:347–354.
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430.
- Farrar J, Nunez J, Davis RM. 2002. Repeated soil application of fungicide reduce activity against cavity spot in carrot. *California Agric.* 56:76–79.
- FRAC. 2011. Pathogens with field resistance towards Qo fungicides. [On-line]. Available: <http://www.frac.info/frac/index.htm>. [accessed December 2011].
- Fry, WE, McGrath MT, Seaman A, Zitter TA, McLeod A, Danies G, Small I, Myers K, Everts K, Gevens A, Gugino BK, Johnson S, Judelson H, Ristaino H, Roberts P, Secor G, Seebold K, Shover-Clift K, Wyenandt A, Grunwald NJ, Smart CD. 2013. The 2009 late blight pandemic in the eastern United States - Causes and results. *Plant Dis.* 97:296–306.
- Gan YT, McDonald CL. 2002. Severity of ascochyta blight vs. leaf type of chickpea. In: Proc. 4th Canadian pulse crop research workshop, Edmonton, AB. Dec. 2002, 270–272.
- Gan YT, Siddique KHM, MacLeod WJ, Jayakumar P. 2006. Management options for minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Res.* 97:121–134.
- Gisi U, Sierotzki H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur J Plant Pathol.* 122:157–167.
- Gisi U, Chin KM, Knapova G, Farber KR, Mohr U, Parisi S, Sierotzki H, Steinfeld U. 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Prot.* 19:863–872.
- Goodwin SB, Smart CD, Sandrock RW, Deahl KL, Punja ZK, Fry WE. 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. *Phytopathology* 88:939–949.
- Gossen BD, Anderson KL. 2004. First report of resistance to strobilurin fungicides in *Didymella rabiei*. *Can J Plant Pathol.* 26:411.
- Gossen BD, Miller PR. 2004. Survival of *Ascochyta rabiei* in chickpea residue on the Canadian prairies. *Can J Plant Pathol.* 26:142–147.
- Gossen BD, Rimmer SR, Holley JD. 2001. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 85:1206.
- Gossen BD, Chang KF, Hwang SF, McDonald MR. 2008. Change in sensitivity of *Ascochyta rabiei* to strobilurin fungicides in Saskatchewan, 2002–2006. *Can J Plant Pathol.* 30:384–385.
- Gossen BD, Peng G, Wolf TM, McDonald MR. 2008. Improving spray retention to enhance the efficacy of foliar-applied disease and pest management products in field and row crops. *Can J Plant Pathol.* 30:505–516.
- Gossen BD, Hwang SF, Taher NH, McDonald MR. 2009. Insensitivity of *Ascochyta rabiei* to strobilurin fungicide in Canada, 2007. *Can J Plant Pathol.* 31:486.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U. 2006. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manage Sci.* 62:465–472.

- Grünwald NJ, Flier WG. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Ann Rev Phytopathol.* 43:171–190.
- Hiltunen LH, White JG. 2002. Cavity spot of carrot (*Daucus carota*). *Ann Appl Biol.* 141:201–223.
- Holley JD, Kawchuk LM. 1996. Distribution of thiabendazole and thiophanate-methyl resistant strains of *Helminthosporium solani* and *Fusarium sambucinum* in Alberta potato storages. *Can Plant Dis Surv.* 76:21–27.
- Holm FA, Zentner RP, Thomas AG, Sapsford K, Légère A, Gossen BD, Olfert O, Leeson JY. 2006. Agronomic and economic crop responses to weed management systems and fungicide in a wheat-canola-barley-pea rotation. *Can J Plant Sci.* 86:1281–1295.
- Hu CH, Perez FG, Donahoo R, McLeod A, Myers K, Ivors K, Secor G, Roberts PD, Deahl KL, Fry WE, Ristaino JB. 2012. Recent genotypes of *Phytophthora infestans* in eastern United States reveal clonal populations and reappearance of mefenoxam sensitivity. *Plant Dis.* 96:1323–1330.
- Jarvis WR. 1977. *Botryotinia* and *Botryis* species: Taxonomy physiology and pathogenicity. Canada Department of Agriculture, Ottawa, ON.
- Kalischuk ML, Al-Mughrabi KI, Peters RD, Howard RJ, Platt HW, Kawchuk LM. 2012. Genetic composition of *Phytophthora infestans* in Canada reveals migration and increased diversity. *Plant Dis.* 96:1729–1735.
- Kawchuk LM, Holley JD, Lynch DR, Clear RM. 1994. Resistance to thiabendazole and thiophanate-methyl in Canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani*. *Amer Potato J* 71:185–192.
- Kawchuk LM, Hutchison LJ, Verhaeghe CA, Lynch DR, Bains PS, Holley JD. 2002. Isolation of the β-tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. *Can J Plant Pathol.* 24:233–238.
- Kawchuk LM, Hwang YT, Wijekoon C, Kalischuk M, Johnson D, Howard R, Prüfer D. 2014. Evolution and prevention of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* in Canada and the United States. *Am J Potato Res.* 91: (In press).
- Keinath A. 2009. Sensitivity to azoxystrobin in *Didymella bryoniae* isolates collected before and after field use of strobilurin fungicides. *Pest Manage Sci.* 65:1090–1096.
- Koller W. 1991. Fungicide resistance in plant pathogens. In: CRC Handbook of Pest Management in Agriculture, 2nd ed. Vol. 2. D Pimentel, Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 679–720.
- Krupinsky JM, Bailey KL, McMullen MP, Gossen BD, Turkington TK. 2002. Managing plant disease risk with diversified cropping systems. *Agron J* 94:198–209.
- Kutcher HR, Brandt SA, Smith EG, Ulrich D, Malhi SS, Johnston AM. 2013. Blackleg disease of canola mitigated by resistant cultivars and four-year crop rotations in western Canada. *Can J Plant Pathol.* 35:209–221. DOI:10.1080/07060661.2013.775600.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker A-S. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *App Env Microbiol.* 76:6615–6630.
- Lobato MC, Olivieri FP, González Altamiranda EA, Wolski EA, Daleo GR, Caldiz DO, Andreu AB. 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *Eur J Plant Pathol.* 122:349–358.
- Lu XH, Davis RM, Livingston S, Nunez J, Hao JJ. 2012. Fungicide insensitivity of *Pythium* spp. associated with cavity spot of carrot in California and Michigan. *Plant Dis.* 96:384–388.
- Lynch DR, Kawchuk LM, Chen Q, Kokko M. 2003. Resistance to *Fusarium sambucinum* in wild and cultivated *Solanum* species. *Amer J Potato Res.* 80: 353–358.
- Ma, Z, Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24:853–863.

- Martinez C, Levesque CA, Belanger RR, Tweedell RJ. 2005. Evaluation of fungicides for the control of cavity spot of carrot. Pest Manag Sci. 61:767–771.
- McDonald MR. 1994. Cavity spot of carrot (*Pythium* spp.): etiology, epidemiology and control [dissertation]. University of Guelph, Guelph, ON.
- Mitchell JA, Cain RB. 1996. Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. Pestic Sci. 48:1–11.
- Mondal SN, Bhatia A, Shilts T, Timmer LW. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. Plant Dis. 89:1186–1194.
- Mueller DS, Wise KA, Dufault NS, Bradley CA, Chilvers MI. 2013. Fungicides for field crops. APS Press, St. Paul, MN.
- Nene YL, Reddy MV. 1987. Chickpea diseases and their control. In: The Chickpea. Saxena MC, Singh KB (Eds), CAB Intern., Wallingford, UK. pp. 233–370.
- Olaya G, Holm A. 2001. Sensitivity of *Didymella bryoniae* isolates to azoxystrobin. Phytopathology 91:S67.
- Pasche JS, Wharam CM, Gudmestad NC. 2003. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to Qo1 fungicides. Plant Dis. 88:181–187.
- Pasche JS, Piche LM, Gudmestad NC. 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. Plant Dis. 89:269–278.
- Peng G, Lahlali R, Hwang SF, Pageau D, Hynes RK, McDonald MR, Gossen BD, Strelkov SE. 2014. Managing clubroot on canola with crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides. Can J Plant Pathol. 36: xxx–xxx. DOI: 10.1080/07060661.2013.860398 (In press).
- Reddy MV, Singh KB. 1990. Relationship between ascochyta blight severity and yield loss in chickpea and identification of resistant lines. Phytopathol Mediterr. 24:32–38.
- Peters RD, Al-Mughrabi KI, Kalischuk ML, Dobinson KF, Conn KL, Alkher H, Islam MR, Daayf F, Lynn J, Bizimungu B, De Koeyer D, Lévesque CA, Kawchuk LM. 2014. Migration and recombination increases *Phytophthora infestans* population diversity and reveals segregation of genotype specific loci. Can J Plant Pathol. 36: (In press).
- Saude C, Simon PW, McDonald MR. 2014. Incidence and severity of cavity spot of carrot as affected by pigmentation and weather. Plant Dis. (in press).
- Statistics Canada. 2011. Canadian Census of Agriculture 2011. Available on-line at: <http://www.statcan.gc.ca/pub/95-640-x/2012002-eng.htm>.
- Stevenson KL, Langston DB, Seibold KW. 2002. Resistance to azoxystrobin in the gummy stem blight pathogen in Georgia. Phytopathology 92:S79.
- Thaher, N. 2011. Fungicide insensitivity in *Ascochyta Rabiei* in Saskatchewan [dissertation]. University of Guelph, Guelph, ON.
- Torriani SFF, Brunner PC, McDonald BA, Sierotzki H. 2008. Qo1 resistance emerged independently at least four times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Manage Sci. 65:155–162.
- Van Der Heyden H, Carisse O, Brodeur L. 2012. Comparison of monitoring based indicators for initiating fungicide spray programs to control botrytis leaf blight of onion. Crop Prot 33:21–28.
- Van der Heyden H, Dutilleul P, Brodeur L, Carisse O. 2014. Spatial distribution of single nucleotide polymorphisms related to fungicide resistance and inference for sampling. Phytopathology (in press)
- Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis GS. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. Plant Dis. 95:1302–1307.
- Walker A, Brown PA, Entwistle AR. 1986. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. Pestic Sci. 17:183–193.
- Warkentin TD, Xue AG, McAndrew DW. 2000. Effect of mancozeb on the control of mycosphaerella blight of field pea. Can J Plant Sci. 80:403–406.

- Wijekoon CP, Peters RD, Al-Mughrabi KI, Kawchuk, LM. 2013. First report of late blight caused by *Phytophthora infestans* clonal lineage US-23 on tomato and potato in Atlantic Canada. Plant Dis. In press. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0807-PDN>.
- Wise KA, Bradley CA, Pasche JS, Gudmestad NC, Dugan FM, Chen W. 2008. Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. Plant Dis. 92:295–300.
- Wise KA, Bradley CA, Pasche JS, Gudmestad NC. 2009. Resistance to Qo1 fungicides in *Ascochyta rabiei* from chickpea in the Northern Great Plains. Plant Dis. 93:528–536.
- Xue AG, Warkentin TD, Gossen BD, Burnett PA, Vandenberg A, Rashid KY. 1998. Pathogenic variation of western Canadian isolates of *Mycosphaerella pinodes* on selected *Pisum sativum* genotypes. Can J Plant Pathol. 20:189–193.
- Ypema HL, Gold RE 1999. Kresoxim-methyl. Plant Dis. 83:4–19.

TABLES

Table 1. Changes in the proportion of the area under conventional field crop management¹ that was treated with fungicide each year, based on Canadian Census of Agriculture figures.

Province	Area (M ha)	Area treated with fungicide (%)				Change over time (%)	
		1996	2001	2006	2011	1996–2006	2006–2011
Alberta	7.0	7.7%	8.1%	9.4%	14.9%	21%	59%
Saskatchewan	10.3	5.3%	9.2%	9.0%	21.3%	70%	136%
Manitoba	3.6	10.2%	21.0%	22.5%	47.1%	121%	110%
Total (Prairies)	20.8	7.0%	10.9%	11.3%	23.4%	61%	107%
Ontario	2.3	7.6%	8.7%	11.1%	16.8%	47%	51%

¹ Estimate based on the area treated with inorganic fertilizer, which excludes organic production and many forage stands (Statistics Canada, 2011).

FIGURES

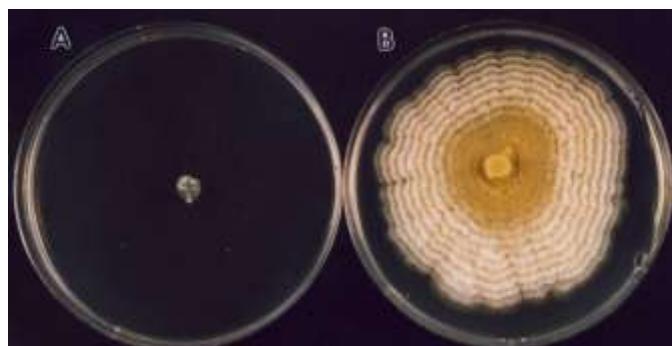


Figure 1. Isolates of *Fusarium sambucinum* recovered from diseased potatoes were placed on Potato Dextrose Agar plates supplemented with 10 mg L⁻¹ thiabendazole to assess fungicide sensitivity. Isolates sensitive (A) or insensitive (B) to benzimidazole fungicides were recovered in similar ratios over a 20-year period.

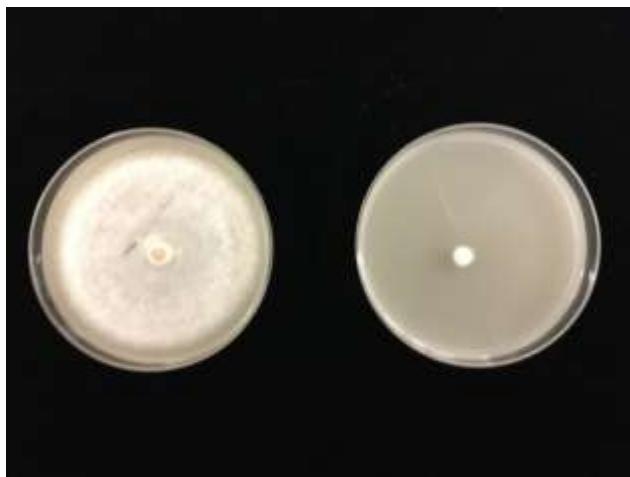


Figure 2. Isolates of *Phytophthora infestans* genotype US-23 grown on V8-potato dextrose medium supplemented with 5 mg L⁻¹metalaxyl. Almost all of the Canadian isolates of *P. infestans* genotype US23 were sensitive to metalaxyl (right) in 2010, but had been replaced by insensitive isolates (left) by 2013.

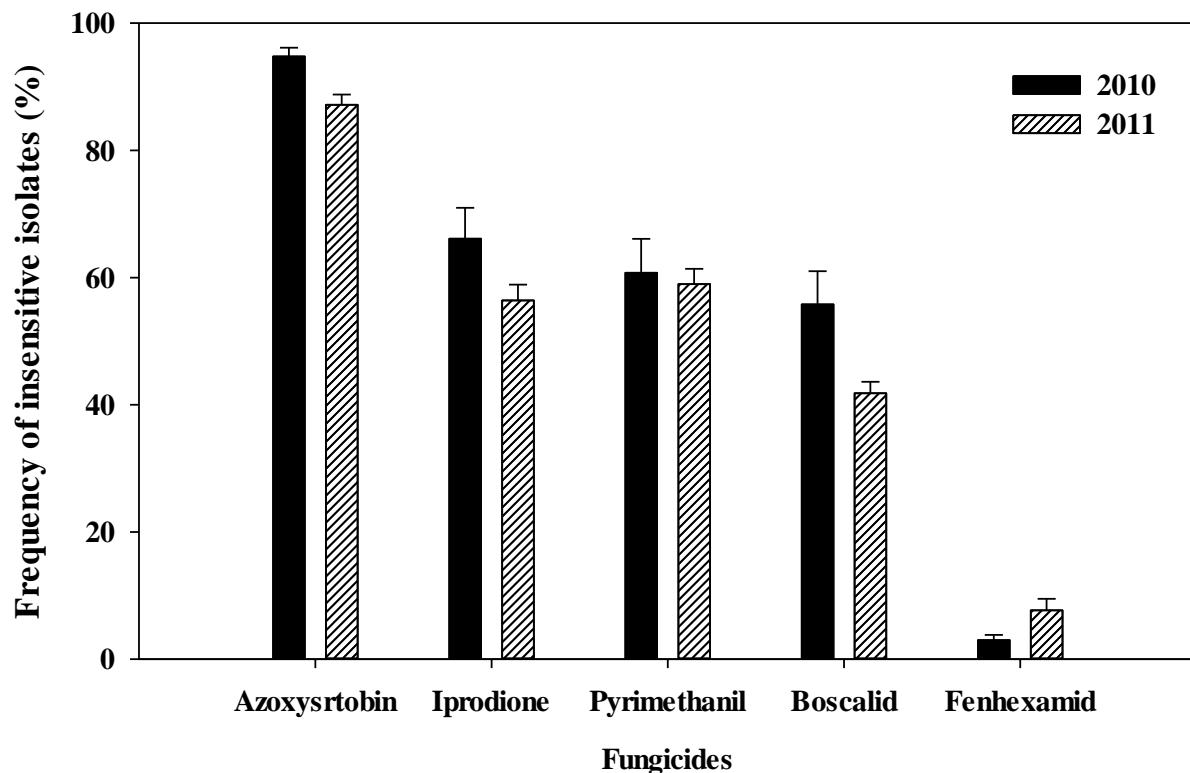


Figure 3. Proportion of isolates insensitive to selected fungicides in a conidial germination assay of 232 *Botrytis cinerea* samples collected from vineyards across Québec in 2010 and 2011. Capped lines indicate the standard error.

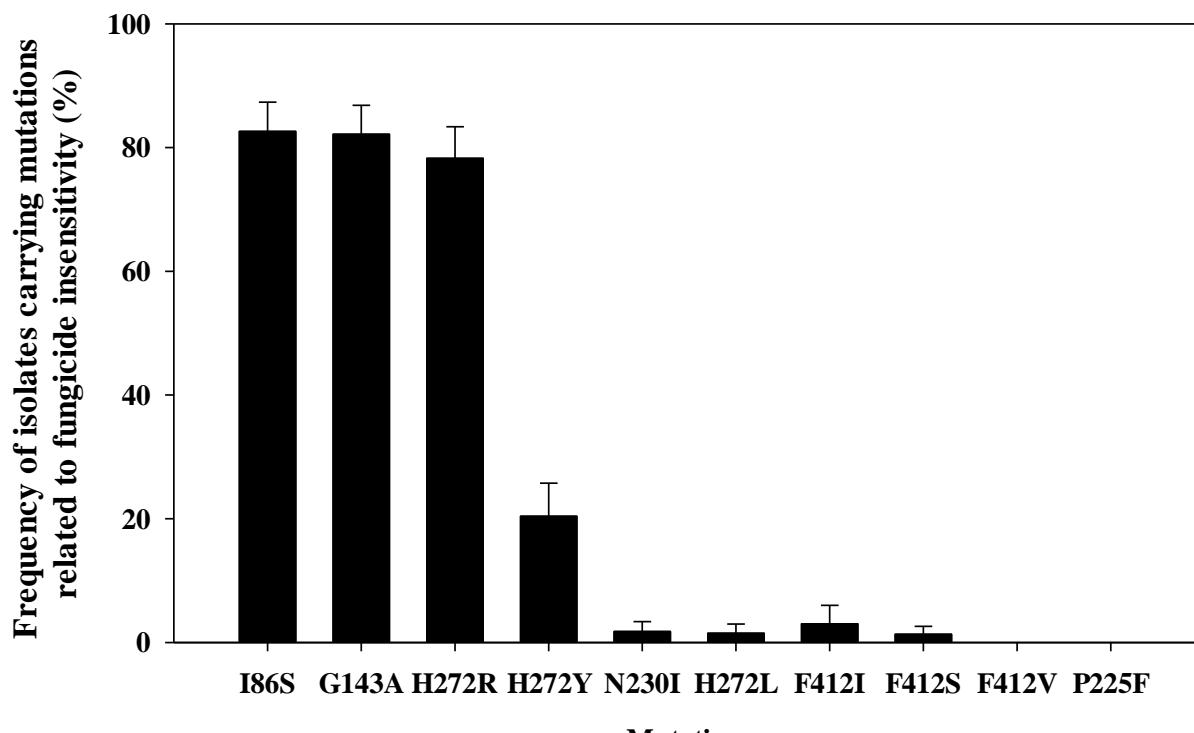


Figure 4. Proportion of single nucleotide polymorphism (SNPs) associated with specific fungicide insensitivity in *Botrytis cinerea* isolates collected from vineyards across Québec in 2012. Capped lines indicate the standard error.

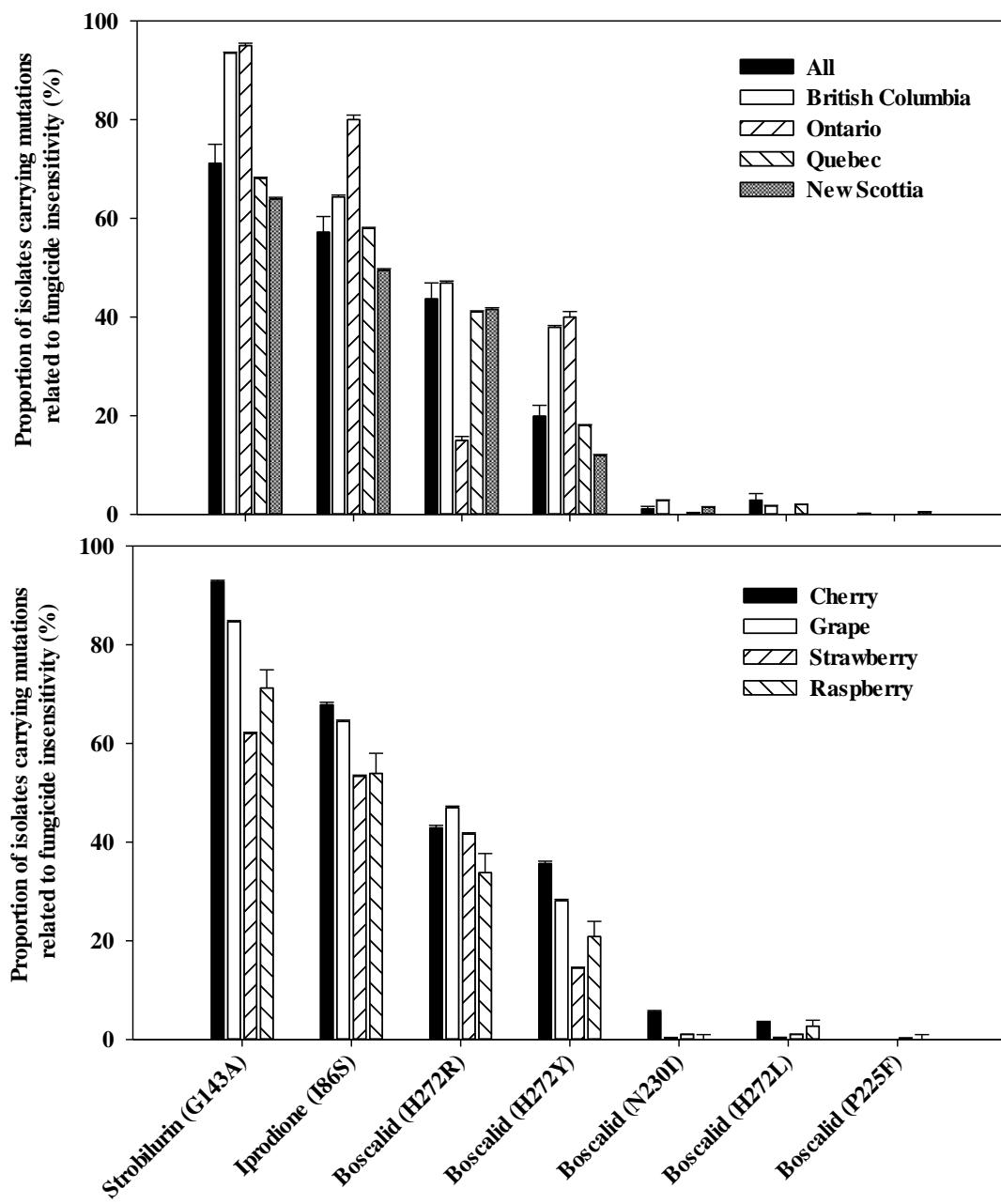


Figure 5. Proportion of single nucleotide polymorphism (SNPs) associated with specific fungicide insensitivity in *Botrytis cinerea* isolates collected from cherry, grape, strawberry and raspberry fields in Nova Scotia, Québec, Ontario and British Columbia in 2012. Capped lines indicate the standard error.