

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**Caractérisation de la diversité des isolats de *Verticillium dahliae* impliqués
dans la mort prématurée de la pomme de terre (PED) dans le territoire
Canadien**

Par

Chary Esteban Quinche Gonzalez

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences, M.Sc.
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Philippe Constant
INRS-AFSB

Examineur externe

Guillaume Bilodeau
Agence Canadienne Inspection des Aliments

Directeur de recherche

Étienne Yergeau
INRS-AFSB

Co-directrice de recherche

Tanya Arseneault
Agriculture et Agroalimentaire Canada

DÉDICACES

Ce mémoire est dédié à ma sœur Melissa Pakarina Quinche Gonzalez qui m'a toujours soutenu et encouragé à approfondir mes bases dans la recherche.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier à mes directeurs de recherche Dr. Étienne Yergeau et Dre. Tanya Arseneault de m'avoir accepté dans leurs équipes de travail, de m'avoir guidé tout au long de mon parcours dans les études supérieures, d'avoir cru dès la première fois en mes capacités et compétences et d'être toujours ouverts à m'aider et m'écouter.

Un remerciement spécial à Josiane Vaillancourt, technicienne du laboratoire de maladies du sol au sein d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Ma profonde gratitude et mon admiration pour toi, merci pour tout le partage de connaissances, conseils et expériences dans le laboratoire, je vais bien les mettre en pratique dans mon futur professionnel.

Merci beaucoup à Benjamin Mimee, Joel Lafond-Lapalme et Pierre-Yves Véronneau pour toute votre aide, conseils et dépannages liés à la bio-informatique. J'ai acquis de très nouvelles connaissances en travaillant avec vous.

Merci au Labo Yergeau pour m'avoir accueilli avec leurs bras ouverts. Spécialement, Sara Correa-Garcia, Liliana del Pilar Quiza et Jessica Dozois. Vous êtes des personnes merveilleuses et j'ai une grande admiration envers vous. Je tiens à remercier à Pau Armoa collègue et amie de l'INRS pour tout l'encouragement et les expériences vécues au long de ma maîtrise.

Un énorme remerciement à ma famille qui est toujours là pour moi. Papito et Mamita même si on est loin vous êtes toujours proche de moi dans mon cœur et dans toutes les expériences que je vis dans ce processus d'immigration. Merci beaucoup Hermanita de m'avoir sauvé et de m'aider à me réinventer de toutes les façons possibles, merci de me montrer l'importance de la persévérance et de me soutenir dans la réalisation de mes rêves. Un remerciement à Kelby, le chien qui prend des cours de maîtrise.

Je remercie également à Paula Velasquez, Camilo Orozco et Ana Maria Quiroga de m'accompagner dans toute cette aventure comme étrangers et d'être un morceau important de la Colombie ici au Québec. Je tiens à remercier aussi à mes amies Jessica Girona, Alexandra Martin et Marie Poulin-Ouellette, je suis vraiment chanceux de vous avoir dans ma vie. Merci Samuel Pison-Lavoie de m'avoir montré le Québec avec un autre regard. Merci également à tous mes amis en Colombie, vous me manquez beaucoup, mais je sais que j'ai toujours un endroit où j'appartiens avec vous. Ce mémoire représente un très grand effort et des très belles expériences personnelles et professionnelles. Ce n'était pas toujours évident, mais toutes les personnes nommées ici ont vraiment contribué pour la réalisation de ce projet.

Gracias a todas y todos!

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

La mort prématurée de la pomme de terre (PED) limite de façon majeure les rendements des agriculteurs cultivant la pomme de terre dans les provinces productrices du Canada. La maladie est principalement causée par le champignon du sol *Verticillium dahliae*, l'espèce la plus répandue au Canada, avec une capacité d'agressivité variable selon l'isolat. L'utilisation de marqueurs génétiques comme les polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) permet d'étudier la génétique des populations. Le projet visait à isoler et caractériser des souches de *V. dahliae* causant le PED dans 6 provinces canadiennes, en termes de diversité génétique des populations (SNP et groupes de compatibilité végétative (VCG)) et de leur agressivité. 192 isolats isogéniques purs de *V. dahliae* ont été obtenus à partir de cultures monosporiques. L'ADN des isolats a été séquencé par séquençage du génome complet (WGS), et ensuite alignée sur le génome de référence VdLs.17 de *V. dahliae* pour mettre en évidence les SNP. Deux lignées clonales prédominantes ont été trouvées dans toutes les provinces et il existe certains sous-groupes par lignée. Chaque population de *V. dahliae* a été comparée à des souches-types provenant de différents VCG, et semblent appartenir aux groupes 4A et 4B. La variabilité de l'agressivité des isolats non liée aux marqueurs génétiques a été évalué avec un essais avec 7 isolats. Ces analyses phylogénétiques et d'agressivité ont donc permis d'avoir un premier aperçu de la variabilité génétique et d'agressivité des populations de *V. dahliae* causant le PED au Canada

Mots-clés : Mort prématurée de la pomme de terre, génétiques de populations, analyse phylogénétique, groupes de compatibilité végétative.

ABSTRACT AND KEYWORDS

Potato Early Dying (PED) is a common limiting factor in potato production in all of the producing provinces of Canada. The disease is mainly caused by the soil fungus *Verticillium dahliae*, which is the most widespread species in Canada, with a variable aggressiveness depending on the isolate. The use of genetic markers such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) makes it possible to study the population genetics. The project aims to isolate and characterize strains of *V. dahliae* causing PED in 6 Canadian provinces, in terms of population genetic diversity (SNPs and compatible vegetative groups (VCG)) and their aggressiveness. 192 pure isogenic isolates of *V. dahliae* were obtained from monosporic cultures. The DNA of the isolates was sequenced by whole genome sequencing (WGS), and then aligned to the VdLs.17 reference genome of *V. dahliae* to highlight SNPs. Two predominant clonal lineages have been found in all provinces and there are some subgroups per lineage. Each population of *V. dahliae* has been compared to type strains from different VCGs, and appears to belong to groups 4A and 4B. The variability in the aggressiveness of isolates unrelated to genetic markers was evaluated with a trial with 7 isolates. These phylogenetic and aggressiveness analyzes therefore provided a first insight into the genetic variability of *V. dahliae* populations causing PED in Canada.

Keywords: Potato Early Dying, population genetics, phylogenetic analysis, vegetative compatibility groups.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	xi
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES TABLEAUX	xvii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Maladie chez les plantes et leur impact sur la production des aliments	1
1.2. La culture de la pomme de terre	2
1.2.1. Origine et taxonomie	2
1.2.2. Production globale.....	2
1.2.3. Production au Canada.....	2
1.2.4. Cultivar	3
1.3. Interaction plante - agent pathogène.....	3
1.4. Potato Early Dying (PED).....	5
1.4.1. Agents responsables/infectieux	6
1.4.2. Contrôle.....	7
1.4.3. Symptômes	8
1.5. <i>Verticillium</i>	10
1.6. <i>Verticillium dahliae</i>	11
1.6.1. Nomenclature	11
1.6.2. Gamme d'hôtes et distribution mondiale	11
1.6.3. Caractéristique morphologiques.....	11
1.6.4. Structures de résistance	12
1.6.5. Cycle de vie	12
1.6.6. Groupes de compatibilité végétative	13
1.6.7. Agressivité de <i>V. dahliae</i> selon le VCG	14
1.7. Génétique des populations.....	14

2.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	17
3.	MÉTHODOLOGIE	19
3.1.	Échantillonnage du sol	19
3.2.	Subérisation des semis.....	19
3.3.	Cultures pièges pour l'isolation de <i>Verticillium dahliae</i>	20
3.4.	Isolation des <i>V. dahliae</i>	20
3.4.1.	Obtention de cultures pure de <i>V. dahliae</i>	21
3.4.2.	Cultures isogéniques monosporiques	22
3.5.	Analyse moléculaire	23
3.5.1.	Préparation du matériel	23
3.5.2.	Extraction d'ADN	23
3.5.3.	Séquençage.....	23
3.5.4.	Traitement des données, appel de variantes et contrôle de qualité.....	24
3.5.5.	Différentiation génétique et structure des populations de <i>V. dahliae</i>	24
3.5.6.	Analyse statistique.....	24
3.5.7.	Caractérisation en groupes de compatibilité végétative de <i>V. dahliae</i>	24
3.6.	Test d'agressivité.....	25
3.6.1.	Préparation de l'inoculum de <i>V. dahliae</i>	25
3.6.2.	Matériel végétal et conditions de croissance	25
3.6.3.	Inoculation de <i>V. dahliae</i> et évaluation de la pathogénicité.....	25
3.6.4.	Dispositif expérimental et analyse statistique	26
4.	RÉSULTATS	29
4.1.	Isolement de <i>Verticillium</i>	29
4.2.	Identification de <i>V. dahliae</i> , génotypage et appel de variantes SNP	31
4.3.	Analyses phylogénétiques	32

4.3.1.	Par SNP	32
4.3.2.	Analyse statistique.....	35
4.3.3.	Lignée 1	35
4.3.4.	Lignée 2.....	37
4.4.	Classification des <i>V. dahliae</i> par VCG.....	38
4.5.	Test d'agressivité.....	39
5.	DISCUSSION	43
6.	CONCLUSION	49
	BIBLIOGRAPHIE	51
	ANNEXE	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Triangle de la maladie (Agrios, 2005)	4
Figure 1.2 : Modèle en zigzag du système de défense chez les plantes en interaction avec un agent pathogène d'après Jones et Dangl, 2006.....	5
Figure 1.3 : Symptomatologie dans les feuilles causées par le PED.....	9
Figure 1.4 : Symptomatologie dans les tiges causées par le PED	10
Figure 1.5 : Morphologie de <i>V. dahliae</i> . prise et modifié de Smith, 2012.	12
Figure 1.6 : Cycle de vie de <i>V. dahliae</i> , adaptée de Berlinger et Powelson, 2000	13
Figure 1.7 : Séquençage du génome complet d'après Green 2001.	15
Figure 3.1 : Schématisation de l'échantillonnage, mis en sac et conservation des échantillons du sol	19
Figure 3.2 : Culture piège de pomme de terre du cv Russet Burbank dans le substrat mélangé avec échantillons du sol des provinces participatives.....	20
Figure 3.3 : Isolation de <i>V. dahliae</i> à partir de tiges des plantes pièges.....	21
Figure 3.4 : <i>V. dahliae</i> isolés à partir de tiges sur milieu PDA avec streptomycine.	21
Figure 3.5 : <i>V. dahliae</i> et micro-sclérotés sur milieu NP-10.	22
Figure 3.6 : Schématisation de la méthodologie pour l'obtention d'une spore de <i>V. dahliae</i> et la production de cultures isogéniques monosporiques	22
Figure 3.7 : Mycélium de <i>V. dahliae</i> lyophilisés.....	23
Figure 3.8 : Échelle visuelle de la progression du PED sur les feuilles et tiges de pomme de terre adaptée de Alkher <i>et al.</i> , 2009.....	27
Figure 4.1 : Isolement de <i>V. dahliae</i> en 2019 et 2020 dans les 6 provinces participatives.	29
Figure 4.2 : Cultures de <i>V. dahliae</i> à partir d'une seule spore sur PDA.....	30
Figure 4.3 : Analyse phylogénétique pour l'identification de <i>V. dahliae</i>	31
Figure 4.4 : Analyse phylogénétique pour le regroupement des séquences de <i>V. dahliae</i> à partir de variantes en SNP trouvées dans le génome de chaque isolat	33
Figure 4.5 : Analyse en composantes principales des variantes en SNP du génome des isolats de <i>V. dahliae</i>	34

Figure 4.6 : Arbre phylogénétique crée à partir de la lignée 1	36
Figure 4.7 : Analyse en composantes principales de la lignée 1	36
Figure 4.8 : Arbre phylogénétique crée à partir de la Lignée 2.....	37
Figure 4.9 : Analyse en composantes principales de la lignée 2	38
Figure 4.10 : Arbre phylogénétique crée avec les variantes communes entre Bautista <i>et al.</i> , 2020 et les isolats obtenues pour la classification de groupes de compatibilité végétative (VCG).....	39
Figure 4.11 : Valeur d’AUDPC total basé sur le pourcentage d’infection des plantes de pomme de terre inoculées avec <i>V. dahliae</i>	40
Figure 4.12 : Moyennes de la décoloration vasculaire de la partie basale, moyenne et supérieur des plantes de pomme de terre, 7 semaines après l’inoculation de <i>V. dahliae</i>	41
Figure S1. Scree plot de l’analyse en composantes principales pour tous les isolats de <i>V. dahliae</i>	59
Figure S2. Scree plot de l’analyse en composantes principales pour les isolats de <i>V. dahliae</i> qui appartient à la lignée 1	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : Conversion de pourcentage de sévérité du PED sur les feuilles et tiges de pomme de terre (d'après Alkher <i>et al.</i> , 2009).	26
Tableau 4.1 : Quantité d'isolats obtenus de <i>Verticillium</i> par province	29
Tableau 4.2 : Base de données de séquençage du génome complet des isolats obtenues de <i>V. dahliae</i>	32
Tableau 4.3 : Nombre d'isolats correspondant à chaque lignée clonale.	34
Tableau 4.4 : Résultats d'un AMOVA effectué sur les variantes des séquences de <i>V. dahliae</i> obtenues dans toutes les provinces participatives.....	35

1. INTRODUCTION

1.1. Maladie chez les plantes et leur impact sur la production des aliments

Les plantes jouent un rôle important dans la vie sur la Terre puisqu'elles constituent les aliments de base pour les animaux et les humains. Ce sont des organismes capables de convertir la lumière du soleil en molécules chimique stockées et utilisables pour la majorité des organismes sous forme de glucides, protéines et graisses. Certains animaux, y compris les humains, dépendent des substances végétales pour survivre. Cependant, les plantes aussi peuvent tomber malades par le biais d'agents pathogènes ou d'autres ravageurs, qui causent des symptômes sur des cultures importantes en milieu agricole et horticole (Agrios, 2005). Les micro-organismes qui agissent en tant qu'agents pathogènes possèdent une reproduction de type asexuée et/ou sexuée, et ont développé plusieurs mécanismes et moyens pour attaquer toutes les plantes et vaincre leur système de défense. Ceci affecte la santé, la croissance et le développement des plantes, ce qui dans la plupart des cas se traduit en diminution du rendement et pertes économiques (Shuping et Eloff, 2017).

Les maladies présentent donc un obstacle majeur dans la production et la qualité des denrées alimentaires importantes. Les quatre cultures de base principales dans la consommation alimentaire mondiale sont le blé, le riz, le maïs et la pomme de terre, donc un intérêt important pour les agents pathogènes affectant ces cultures a été développé au cours des années (Chakraborty et Newton, 2011), tant au champ qu'après la récolte. Les principaux groupes d'agents pathogènes sont les virus, les bactéries, les oomycètes, les champignons, les nématodes et les parasites végétaux (Agrios, 2005). Historiquement, deux agents pathogènes importants ont eu des répercussions socio-économiques extrêmes. Le premier est *Phytophthora infestans*, qui en 1840, en Irlande, a causé la brûlure de la pomme de terre qui a entraîné la mort d'un million de personnes dû à la famine ainsi que des nombreuses immigrations dû à la dépendance que la population irlandaise présentait à la pomme de terre. Le manque de plantes résistantes à la maladie à cette époque et les conditions météorologiques favorisant la maladie ont été à la base de cet événement catastrophique (Strange et Scott, 2004). Un autre exemple est l'agent pathogène *Helminthosporium oryzae*, un champignon qui a causé la famine Bengale et des effets similaires quant à la mort de la population indienne affectée à cause d'une forte dépendance à la culture du riz (Padmanabhan, 1973). Dean *et al.*, en 2012, présentent les 10 agents pathogènes fongiques ayant le plus d'importance économique, tel que *Magnaporthe oryzae* affectant la culture du riz, *Botrytis cinerea* qui a un grand impact en raison de la large gamme d'hôtes et les dommages causés avant et après la récolte, les espèces qui appartiennent au genre *Puccinia* qui cause des rouilles chez le blé, des espèces du genre *Fusarium* comme *F. graminearum* et *F. oxysporum* affectant principalement les céréales, quelques espèces non-céréalières et une large gamme d'hôtes, parmi d'autres

micro-organismes mentionnés. Donc, ces agents pathogènes fongiques mettent clairement en évidence l'impact potentiel énorme sur la production des plantes et la sécurité alimentaire.

1.2. La culture de la pomme de terre

1.2.1. Origine et taxonomie

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante herbacée qui appartient à la famille des Solanacées, une famille qui comprend environ 90 genres et plus de 2000 espèces. Le genre *Solanum* est polymorphe (morphologies variées entre différentes espèces) et regroupe plus de 1000 espèces trouvées principalement dans les régions tropicales et subtropicales (Fernarld, 1970).

L'origine de cette plante remonte à au moins 8000 ans dans les régions montagneuses d'Amérique du Sud (Rousselle *et al.*, 1996), introduite par les Espagnols en Europe dans les années 1590 et ensuite distribuée dans le monde (Brown, 1993).

1.2.2. Production globale

La pomme de terre est cultivée et consommée dans le monde entier, c'est la troisième culture la plus importante (FAO, 2013) et un aliment de base dans les régimes alimentaires à l'échelle mondiale. Elle constitue l'une des cultures qui fournissent 50% des besoins énergétiques alimentaires mondiaux avec le riz, le blé et le maïs (Wijesinha-Bettoni et Mouillé, 2019). La production mondiale de pommes de terre en 2019 était en moyenne de 370 millions de tonnes (AAC, 2021). La Chine est le premier producteur mondial de pomme de terre avec 22% de la production mondiale, suivie de l'Union européenne (19%), la Russie (11%), l'Inde (8%), l'Ukraine (6%) et les États-Unis (5,4%) (Drouin, 2008).

1.2.3. Production au Canada

Le Canada contribue à environ 1,5% de la production mondiale de pommes de terre (Drouin, 2008). Au Canada, la pomme de terre est la culture légumière qui représente 27,3% des recettes totales de la production de légumes. En 2021, la production a atteint 12,31 millions de tonnes, avec une augmentation de 18,2% par rapport à l'année précédente, en raison de l'augmentation de la superficie ensemencée ainsi que du rendement. La province de l'Île-du-Prince-Édouard produit la plus grande part des pommes de terre canadiennes avec 23,2 %, suivie de l'Alberta (20,0%), et du Manitoba (19,6%). D'autres provinces comme le Nouveau-Brunswick et l'Alberta ont enregistré une production record en 2021 (+58,3% et +5,2%) en

raison de l'augmentation de la superficie ensemencée pour répondre à la demande de transformation (STATCAN, 2022).

1.2.4.Cultivar

Plusieurs variétés de pomme de terre sont choisies en fonction de leurs attributs génétiques et de leur capacité de transformation pour la production de frites et croustilles. Des variétés comme Russet Burbank, Shepody et Ranger Russet sont les plus souvent utilisées (MAFRI, 2003). Russet Burbank est le cultivar de pomme de terre le plus cultivé au monde (Davis, 1992). Il est devenu le cultivar de pomme de terre dominant en Amérique du Nord au cours du XXe siècle (Bethke *et al.*, 2014). Il possède un rendement moyen à élevé au Canada, a une belle apparence et se conserve bien. Pour maximiser sa qualité et éviter la production de tubercules difformes, elle a besoin d'un apport constant d'eau. Ce cultivar est très sensible à la pourriture sèche fusarienne causé par *Fusarium coeruleum*, le mildiou causé par *Phytophthora infestans*, des pourritures causées par *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Erwinia carotovora* et *Pythium* sp., et la verticilliose entre autres (ACIA, 2022).

1.3. Interaction plante - agent pathogène

Le triangle de la maladie a été publié pour la première fois par Stevens, 1960. Ce triangle (Figure 1.1) montre de manière concise le phénomène de la maladie des plantes comme occupant l'espace intérieur d'un triangle avec les trois composantes essentielles : l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement (Francl, 2001). Une plante peut devenir malade lorsqu'elle entre en contact avec un agent pathogène, en fonction des conditions entourant l'interaction : la susceptibilité de l'hôte, la virulence de l'agent pathogène et les conditions environnementales. Par exemple, si les conditions environnementales ne sont pas favorables à l'agent pathogène, il sera incapable d'infecter l'hôte. Dans le cas des spores pathogènes fongiques une humidité appropriée est nécessaire pour la germination des spores, alors qu'aucune maladie ne se développera quand la plante est résistante (Agris, 2005). Lorsque les conditions sont favorables, les agents pathogènes sont capables de former des structures d'infection comme les appressoriums et la cheville d'infection, donc les hyphes vont pénétrer dans l'hôte et la maladie se développera (Chitarra *et al.*, 2004).

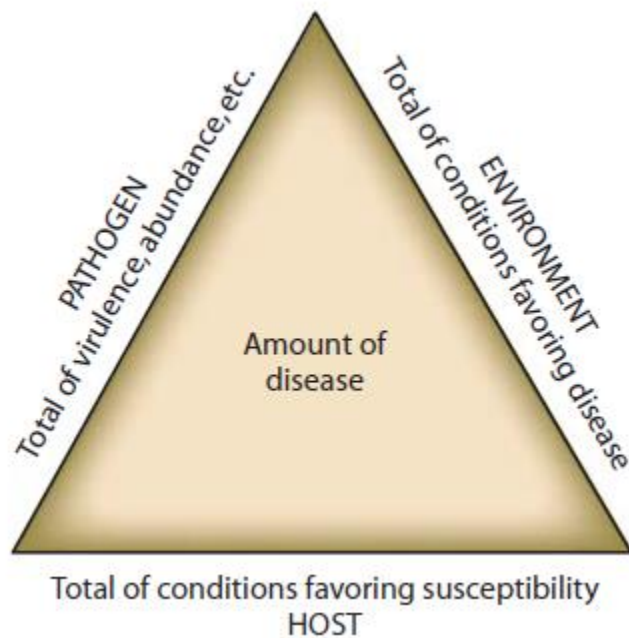


Figure 1.1 : Triangle de la maladie (Agrios, 2005)

Les agents pathogènes utilisent différentes stratégies pour attaquer et pénétrer les plantes, soit de façon mécanique, à l'aide de la production de composantes chimiques ou par des ouvertures naturelles dans la plante. Chez les plantes, plusieurs mécanismes de défense sont activés lors de la reconnaissance d'un agent pathogène (Agrios, 2005).

Le modèle en zigzag proposé par Jones et Dangl en 2006, permet de mieux comprendre cette situation, où le processus de défense est divisé en 4 étapes (Figure 1.2). Tout d'abord, des récepteurs de reconnaissance de forme transmembranaires (PRR) vont reconnaître des patrons moléculaires aux agents pathogènes (PAMP, diamants en rouge) ce qui va déclencher une immunité par la présence de PAMP (PTI). Bien que ce système d'immunité PTI soit efficace, au cours des années, les agents pathogènes sont capables de produire des effecteurs (cercles rouges) qui désactivent la reconnaissance PAMP ce qui cause une susceptibilité dans l'hôte déclenchée par l'effecteur (ETS).

Ensuite, la plante est capable de produire des protéines R de résistance qui vont désactiver les effecteurs produits pour l'agent pathogène, donc ces effecteurs deviennent des facteurs d'avirulence (Avr-R, en rouge) conduisant à une immunité déclenchée par l'effecteur (ETI). Cette immunité est principalement associée à la mort cellulaire hypersensible (HR). Finalement, l'agent pathogène produira des nouveaux effecteurs (cercles en bleu) qui vont supprimer l'ETI et déclencher l'ETS et ensuite, l'hôte produira des nouvelles protéines codés par les gènes R, donc des facteurs d'avirulence (Avr-R en bleu) et l'ETI sera activé. La

défense de la plante est représentée par les flèches qui montent et la susceptibilité par les flèches qui descendent en forme de zig-zag.

Les agents pathogènes qui réussissent à vaincre ce système de défense PTI et ETI, en évoluant leur gènes de virulence, provoquent des maladies végétales qui peuvent entraîner des épidémies.

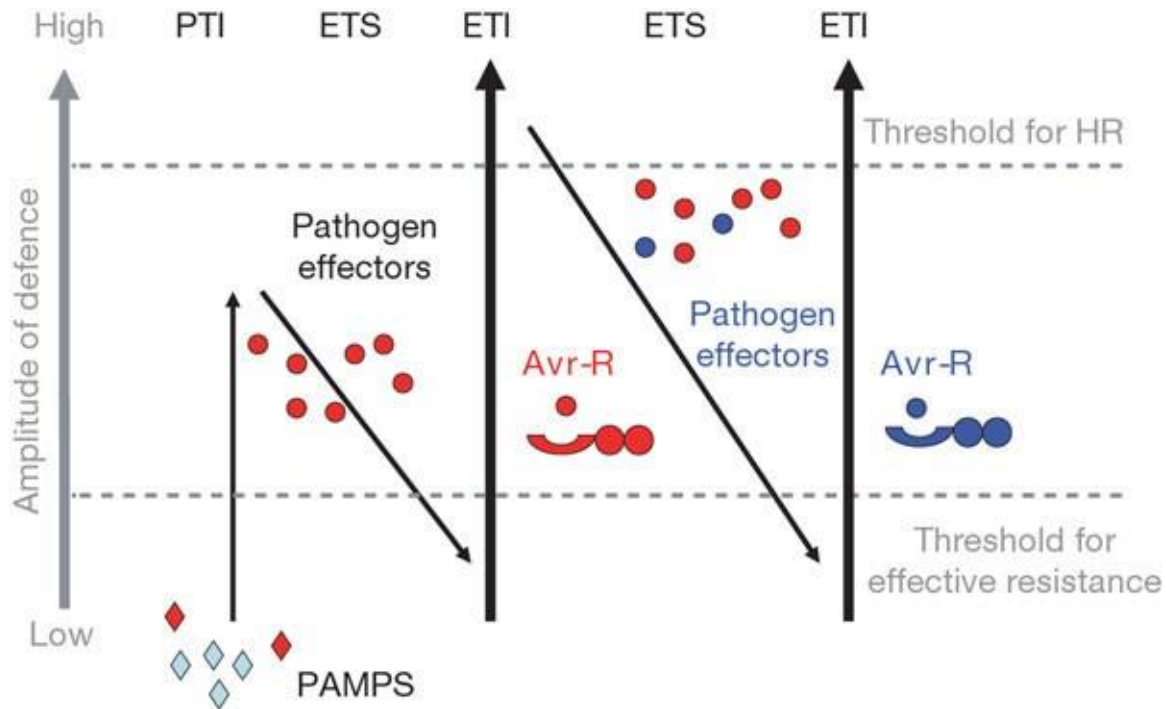


Figure 1.2 : Modèle en zigzag du système de défense chez les plantes en interaction avec un agent pathogène (d'après Jones et Dangl, 2006).

1.4. Potato Early Dying (PED)

Dans les régions arides et semi-arides, la mort précoce de la pomme de terre ou « potato early dying » (PED) est un facteur limitant dans la production de pommes de terre (Rowe et al. 1987). La maladie se développe principalement au milieu de la saison de croissance et une réduction significative de la taille des tubercules et du rendement total commercialisable est observé quand la maladie se développe principalement dans la période de gonflement maximal des tubercules et peut varier en fonction du cultivar semé dans le champ. (Rowe et Powelson. 2002). Cette maladie est une menace sérieuse pour les producteurs et les transformateurs, car 75% de la superficie productive de pommes de terre en Amérique du Nord est plantée avec des cultivars qui présentent une sensibilité modérée à élevée au PED (Jansky et Rouse 2000). Elle a été retrouvée dans toute l'Amérique du Nord, principalement dans les régions de l'ouest et du Pacifique, et dans des régions nord-est des États-Unis et du Canada (Rowe et Powelson, 2002). L'effet du PED sur le

rendement de pomme de terre est très variable. Dans les champs affectés de façon modérée, on peut facilement observer de 10 à 15% de pertes, tandis que dans les champs gravement affectés, la maladie peut causer 30 à 50% des pertes totales (Rowe *et al.*, 1987).

1.4.1. Agents responsables/infectieux

Les champignons du sol du genre *Verticillium* sont les principaux agents pathogènes du PED dans les cultures de pomme de terre en Amérique du Nord. Deux espèces en particulier sont principalement impliquées : *V. albo-atrum* et *V. dahliae*, parmi d'autres. Au début des années 1970, les deux espèces étaient considérées comme des formes de *V. albo-atrum*, mais elles sont maintenant généralement reconnues comme des espèces distinctes (Rowe *et al.*, 1987). Les différences de morphologie des conidiophores, des conidies et la production de micro-sclérotés supportent leur différente affiliation (Smith, 2012). Actuellement *V. dahliae* est devenu le plus répandu des deux espèces et prédomine dans le centre-nord et le nord-ouest du Pacifique dans les États-Unis (Borza *et al.*, 2018). Au Canada, il a été rapporté pour la première fois par Aube et Sackston en 1964 dans des plantes de luzerne à Normandin, Québec, Vancouver et en Colombie Britannique (Sheppard, 1979). En 2017, Borza *et al.* ont rapporté une distribution omniprésente de *V. dahliae* dans la province de l'Île-du-Prince-Édouard en comparaison avec *V. albo-atrum* qui a été plus retrouvé au Nouveau-Brunswick et en Nouvelle-Écosse.

Des études ont démontré que le PED est une maladie complexe, avec plusieurs agents causaux pouvant interagir, dont les nématodes (Burpee et Bloom, 1978). Les nématodes causant des lésions racinaires du genre *Pratylenchus* spp. sont des endoparasites migrants qui peuvent pénétrer dans les tissus racinaires et s'en nourrir. Ils peuvent également se déplacer librement dans le sol de racine à racine. Si les populations de nématodes des racines dans le sol sont assez élevées, la croissance et le développement de la pomme de terre peuvent être affectés (Tenuta, 2018). Les espèces les plus répandues à l'Est du Canada sont *P. penetrans* et *P. crenatus*. *P. penetrans* peut interagir avec *V. dahliae*, et aggraver les symptômes liés au PED (Chen *et al.*, 2022). Des études faites entre 2014 à 2016 dans les provinces du Nouveau-Brunswick et de l'Île-du-Prince-Édouard ont démontré des densités de populations très élevées de *V. dahliae* et *P. penetrans* et donc des plantes présentant des symptômes plus sévères du PED (Tenuta, 2018).

Le mécanisme d'interaction synergique *Verticillium-Pratylenchus* dans le PED n'est pas bien connu, il existe des hypothèses qui indiquent que cette interaction est due aux lésions racinaires racines causées par l'alimentation du nématode, en faisant des nouvelles portes d'entrée qui vont premièrement activer le système de défense dans la pomme de terre et ensuite permettre une meilleure colonisation de l'agent pathogène fongique (Powelson et Rowe, 1993). Cette interaction est peut-être en partie expliquée par les

exsudats racinaires qui sont produites en réponse à l'attaque des nématodes sur les racines des plantes, et qui stimuleraient la germination des micro-sclérotos de *Verticillium* dans le sol (Robertson, 2020). En 1982, Martin *et al.* ont évalué les effets de *P. penetrans* et *V. dahliae* sur la croissance et le rendement des pommes de terre en testant plusieurs combinaisons de densité de populations de nématodes (faible, moyenne, et élevée), avec différentes densités d'inoculum du champignon (faible, moyenne et élevée). Les résultats ont démontré une diminution dans le poids des parties supérieures de la plante (75%), des racines (60%) et des tubercules (36%), en présence des deux micro-organismes. Par contre, quand chaque micro-organisme est présent de façon individuelle, le poids de la partie supérieure de la plante et des racines ne diminue pas (Martin *et al.*, 1982).

Il existe d'autres organismes qui ont également été associés au complexe du PED, mais leur présence peut varier en fonction des zones de production de pommes terre où ils se retrouvent et également selon conditions d'irrigation. Des organismes tels que *Erwinia carotovora* et *Colletotrichum coccodes* sont souvent associés au PED, cependant l'agent pathogène primaire demeure *V. dahliae* (Powelson et Rowe, 1993).

1.4.2. Contrôle

Les méthodes de contrôle du PED visent principalement à réduire les populations des agents pathogènes comme *V. dahliae* et *P. penetrans* dans le sol. Ceci est cependant extrêmement difficile à cause de la capacité de survie de ces agents pathogènes dans le sol. La fumigation, qui consiste à introduire des produits chimiques dans le sol à l'aide d'un applicateur à injection ou dans l'eau par le system d'irrigation, peut être un des moyens plus efficace pour contrôler les maladies transmises par le sol. Au Canada la fumigation du sol au cours des dernières années a été faite pour réduire les effets du PED et améliorer le rendement des pommes de terre (Powelson et Rowe, 1993).

L'utilisation de nématicides a aussi permis de réduire l'impact du PED, cependant elle n'a pas un effet direct sur le niveau des populations de *V. dahliae* dans le sol. De plus, les populations du champignon sont capables de se rétablir à la présence d'une culture hôte comme la pomme de terre. D'un autre côté, l'utilisation des produits chimiques peut causer des effets négatifs non-ciblés sur l'environnement, la santé humaine et la santé des sols. Ceci inclue la contamination des nappes phréatiques, la dérive des produits appliqués, l'élimination des micro-organismes bénéfiques du sol importants pour les cycles biogéochimiques, la structure du sol et l'incompatibilité avec des pratiques de lutte biologique, entre autres. En plus, le coût de production peut augmenter en raison de l'augmentation d'application des pesticides (Chen, 2022; Powelson et Rowe, 1993; Tenuta, 2018).

Le rotation des cultures pour le contrôle du PED est pratiquée dans une moindre mesure, en raison que plusieurs cultures comme le maïs, les graminées, l'oignon, la carotte, entre autres sont cultivées en rotation avec des pommes de terre mais ne servent pas d'hôtes de *Verticillium* (Powelson et Rowe, 1993).

Le contrôle génétique par l'utilisation des variétés résistantes est une option économique dans plusieurs systèmes de culture, cependant pour la pomme de terre, il n'existe pas de variétés hautement résistantes qui maintiennent les propriétés nécessaires, pour la transformation par exemple. La variété la plus cultivée en Amérique du Nord est le cultivar Russet Burbank à cause des demandes du marché mais ce cultivar est modérément sensible au PED (Robertson, 2020).

1.4.3.Symptômes

Feuilles: Mort précoce des feuilles généralement acropète, c'est-à-dire les feuilles inférieures sont les premières touchées. De plus, elles montrent un flétrissement unilatéral ou une chlorose unilatérale de la feuille ou de la tige qui progresse vers le tiers supérieur, conduisant à la mort des feuilles par nécrose mais qui restent attachée à la tige. La mort des feuilles peut commencer par les extrémités en allant vers le centre, provoquant une lésion typique en forme de V (Figure 1.3) (Richard et Boivin, 2004).



Figure 1.3 : Symptomatologie dans les feuilles causées par le PED.

A : Chlorose unilatérale. B : Flétrissement unilatéral. C: Bordure de feuilles flétrissées, lésion en forme de V. D : Feuilles nécrosées qui restent attachées à la tige. E : Chlorose feuille basale.

Tiges: Nécrose complète des tiges qui sénescent prématurément et peuvent rester en position verticale. En plus, une décoloration vasculaire bronzée a lieu près de la base de la tige (Puhalla et Hummel, 1983); les faisceaux vasculaires des tiges atteintes présentent une couleur brun foncé (Figure 1.4), les pousses atteintes sont pliées et tordues dans la partie de la tige qui rejoint le tubercule (Torres, 2002).

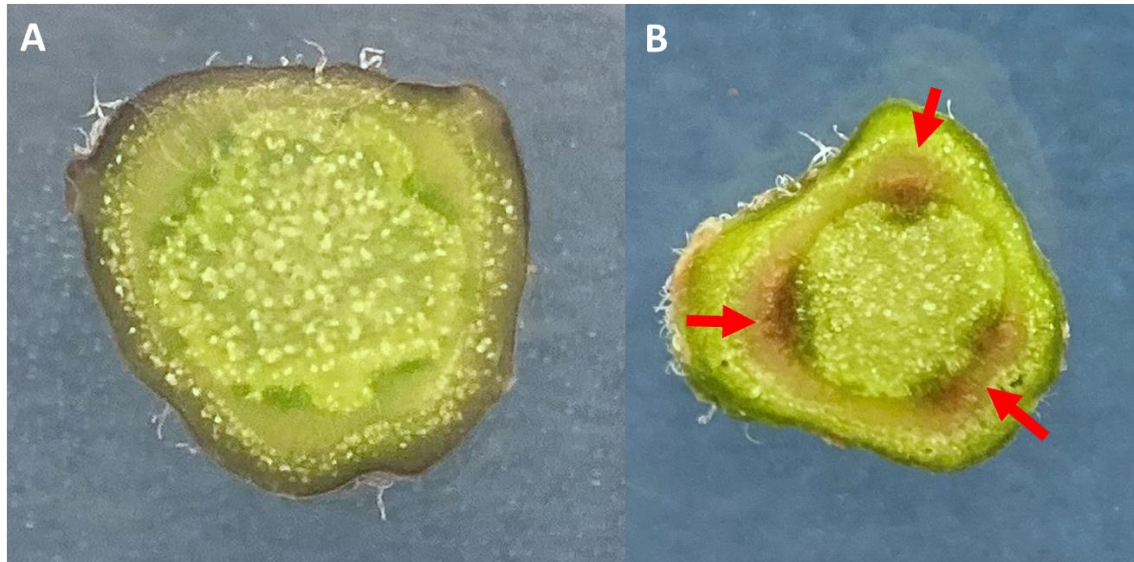


Figure 1.4 : Symptomatologie dans les tiges causées par le PED. A : Faisceaux vasculaires de plante non-inoculé (sain). B : Décoloration des faisceaux vasculaires de plante malade par PED (Brunissement)

Tubercules: Les plantes atteintes produisent de petits tubercules; la quantité n'est pas réduite mais il y a une réduction du poids. Les tubercules atteints présentent un anneau vasculaire jaune intense (Torres, 2002) et parfois une décoloration unilatérale (AAC, 2009).

1.5. *Verticillium*

Le genre *Verticillium* est un des genres connu depuis le plus long temps de champignon filamenteux; il a été décrit en 1817 par Nees von Essenbeck qui a noté des conidiophores ramifiés en forme de verticilles. Dans ce genre, il est possible de trouver plusieurs espèces qui ont une large gamme d'hôtes : Plantes, insectes, nématodes et d'autre champignons (El-Bebany, 2010). La première espèce de *Verticillium* phytopathogène décrite a été *V. albo-atrum* à partir de pommes de terre malades, et avec le temps plusieurs espèces ont été ajoutées pour devenir un genre très diversifié (Inderbitzin et Subbarao, 2014).

La classification du genre *Verticillium* a été décrit par Fradin et Thomma en 2006 :

Règne : Fungi

Divison : Ascomycota

Subdivision : Pezizomycotina

Classe : Sordariomycetes

Ordre : Phyllachorales

Genre : *Verticillium*

Les espèces phytopathogènes les plus souvent retrouvés sont : *V. albo-atrum*, *V. alfalfae*, *V. tricopus*, *V. nigrescens*, *V. nubilum* et *V. dahliae*. Tel que discuté précédemment, *V. dahliae* et *V. albo-atrum* causent des flétrissures chez la pomme de terre alors que les autres espèces sont moins agressives (Robertson, 2020). Étant donné que *V. dahliae* est l'espèce liée au PED la plus présente dans toutes les provinces du Canada, cette étude s'est concentrée sur celle-ci.

1.6. *Verticillium dahliae*

1.6.1. Nomenclature

Le champignon du sol *Verticillium dahliae* est un champignon qui appartient au groupe des Deutéromycètes, principalement caractérisés par l'absence d'une phase sexuée connue (Fradin et Thomma, 2006). Il a été isolé pour la première fois de plantes de dahlia infectés, et décrit en 1913 par Klebahn (El-Bebany, 2010).

1.6.2. Gamme d'hôtes et distribution mondiale

V. dahliae est répandu au niveau mondial. Il présente une gamme d'hôtes très élevée comprenant 200 espèces des dicotylédones comme des herbacées annuelles, des vivaces et des ligneuses, puisque sa croissance est favorisée principalement à des températures comprises entre 18 ° et 29 ° C. Il existe des différences dans la virulence des isolats et la capacité de croissance dans une plage de température plus large (Dennis et al., 2010), ce qui peut influencer sur la sévérité des symptômes observés.

1.6.3. Caractéristique morphologiques

Dans son hôte naturel, *V. dahliae* présente des conidiophores cloisonnés entièrement hyalins positionnés en forme de verticilles, de petites conidies (Figure 1.5), avec une taille de 3 à 6 µm par 1,5 à 2 µm, et des micro-sclérotés noirs (Smith, 2012). Chez son hôte, les conidiophores sont produits à l'intérieur des vaisseaux du xylème, ce qui permet une propagation systémique extrêmement rapide du parasite (Richard et Boivin, 2004).

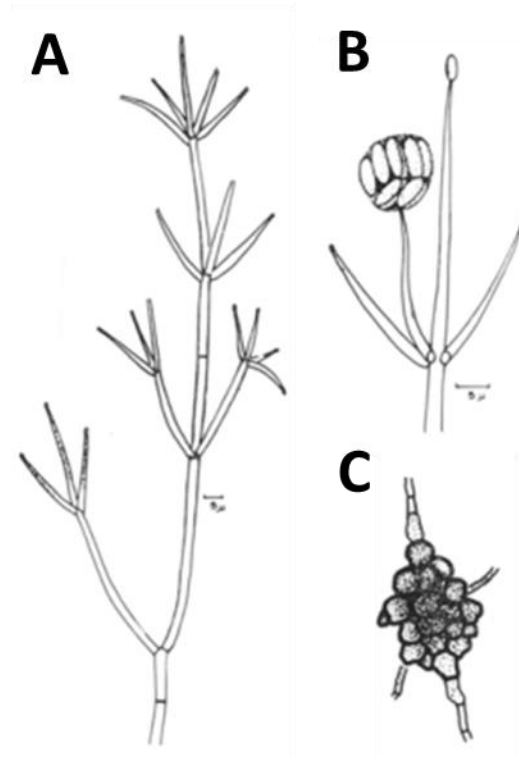


Figure 1.5 : Morphologie de *V. dahliae*. A : Conidiophore cloisonnées, B : Conidiophore en forme de verticille et cluster de conidies, C : Micro-sclérotés. Figure prise et modifié de Smith, 2012.

1.6.4. Structures de résistance

Les micro-sclérotés de *V. dahliae* sont des structures de survie du champignon lorsque l'hôte sensible est absent. Ils se forment dans les tissus végétaux sénescents et peuvent persister dans le sol de 10 à 25 ans (Goud et Termorshuizen, 2003). Ce sont de cellules d'hyphes épaisses de couleur noir et ils possèdent un diamètre de 30 à 60 μm (Alkher, 2009). La quantification des micro-sclérotés comme source d'inoculum initial est important pour les modèles de prédiction et le contrôle de la maladie (Fradin et Thomma, 2006).

1.6.5. Cycle de vie

Le champignon hiverne sous forme de micro-sclérotés (*V. dahliae*) dans le sol ou dans les débris végétaux, les tubercules infectés ou dans les mauvaises herbes. Au printemps, les micro-sclérotés germent par temps froid et en présence d'exsudats racinaires, le champignon pénètre dans la plante à travers le système racinaire, directement dans les cellules de l'épiderme racinaire et bien que *Verticillium* ne produit pas d'appressorium, l'entrée de l'hyphe est facilitée par des blessures ou des fissures causées dans les sites de formation radriculaire latérale (Toueni, 2014). Par la suite, le champignon pénètre dans les vaisseaux

conducteurs du xylème où il se multiplie, les obstruant et interférant avec le transport de l'eau et des éléments minéraux (AAC, 2011), c'est pourquoi sa présence s'exprimera principalement dans les organes aériens de la plante (flétrissement). Une inspection rapide sur le terrain, le déracinement des plantes, la vérification du système racinaire et la réalisation de coupes longitudinales ou transversales de la tige permettent d'observer l'état phytosanitaire de la culture (AAC, 2004). Dans la phase saprophyte, le champignon sort de la tige et colonise tous les tissus de la plante, formant à nouveau des structures de dormance dans le parenchyme, et redevenant une source d'inoculum initial (Toueni, 2014) (Figure 1.6).

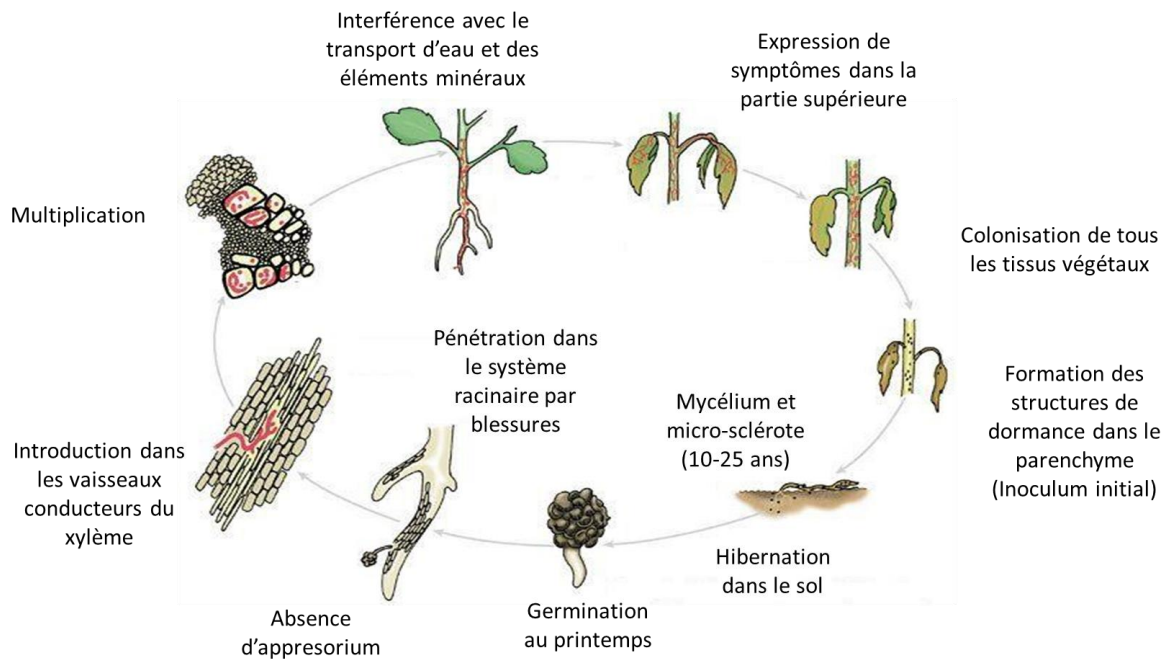


Figure 1.6 : Cycle de vie de *V. dahliae*, adaptée de Berlinger et Powelson, 2000

1.6.6. Groupes de compatibilité végétative

Les souches de *V. dahliae* associées au PED peuvent être classées en quelques groupes sous-spécifiques afin de caractériser leur variation génétique (Hiemstra et Rataj-Guranowska, 2003). Ces groupes sont différenciés sur la base de la compatibilité végétative (VCG), un portrait multigénique qui détermine la capacité d'isolats fongiques distincts d'une même espèce à s'anastomoser et à former des hétérocaryons (Dobinson et al., 2007). Les hétérocaryons sont des hyphes de mycélium contenant chacun des noyaux génétiquement différents. Étant un champignon deutéromycète, l'échange d'information génétique ne se fait pas par la reproduction sexuée, donc l'anastomose est le seul moyen pour le genre *Verticillium* d'augmenter sa diversité génétique (Berlinger et Powelson, 2000). Cette technique est principalement

utilisée pour étudier les champignons dont le cycle de reproduction sexuée n'est pas connu (Hiemstra et Rataj-Guranowska, 2003).

1.6.7. Agressivité de *V. dahliae* selon le VCG

Deux VCG ont été identifiés chez *V. dahliae* qui sont capables d'infecter la pomme de terre: VCG2 et VCG4, qui ont ensuite été subdivisés en sous-groupes. Le VCG2 comprend les sous-groupes 2A et 2B, dont le groupe 2A a comme hôte la pomme de terre et le VCG4 comprend les sous-groupes 4A, 4B et 4A/B. La majorité des isolats associés au PED appartiennent aux VCG4A et 4B. Bien qu'il y ait une variation considérable de l'agressivité des isolats individuels de *V. dahliae* sur la pomme de terre, les isolats VCG4A sont les plus préoccupants pour la production de pommes de terre en Amérique du Nord, parce qu'ils sont plus agressifs que les isolats VCG4B et interagissent en synergie avec le nématode des lésions racinaires *P. penetrans*, causant une sénescence prématurée de la plante et de faibles rendements en tubercules (Dobinson et al., 2007).

1.7. Génétique des populations

La génétique des populations est l'étude de l'influence des processus évolutifs sur la diversité génétique d'une population. Elle permet de comprendre les processus de la dérive génétique aléatoire, les mutations, le flux de gènes, et la recombinaison dans des populations des pathogènes de plantes (Grunwald *et al.*, 2017). La diversité génétique peut être étudiée grâce à la présence de certains polymorphismes identifiables comme marqueurs génétiques, les plus utilisés étant les microsatellites et les polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) (Van der Heyden *et al.*, 2021). Le développement des méthodes à haut débit pour la détection des SNP ont beaucoup changé l'utilisation de marqueurs moléculaires dans les analyses génétiques. Chez *V. dahliae*, la variation génétique a été étudiée principalement par analyse de compatibilité végétative (Collado-Romero, *et al.*, 2008). En étant un champignon du groupe de deutéromycètes, leur reproduction est principalement clonale (à l'opposé d'une reproduction sexuée), expliquant pourquoi les populations de *V. dahliae* comprennent un nombre limité des lignées clonales, qui ont une forte corrélation avec les VCG, et peuvent être identifiés à l'aide de l'utilisation des SNP (Bautista, *et al.*, 2020).

De plus, les technologies de nouvelle génération (NGS) ont permis une amélioration dans les études de population génétiques, en utilisant des méthodes qui vont séquencer des nucléotides plus rapidement avec un coût par nucléotide moins élevé (Park et Kim, 2016). Le séquençage du génome complet (« whole genome sequencing » -WGS) « shotgun » permet d'étudier un seul gène ou des génomes individuels, de

mieux évaluer les niveaux de diversité phylogénétique et dans certains cas de reconstruire des séquences génomiques presque complètes, entre autres avantages (Chen et Pachter, 2005).

Le séquençage de génome complet « shotgun » consiste principalement à fragmenter le génome entier d'un organisme en fragments de tailles définies au hasard. Chaque fragment est ensuite séquençé individuellement (reads) et puis assemblé à l'aide d'un ordinateur en contigs d'une taille plus grande. Ensuite, les contigs sont reliés ensemble pour former des structures appelées « scaffolds », qui ont une taille plus grande et dans lesquelles il peut avoir des espaces manquants entre les contigs assemblés. Les trous seront remplis grâce à la cartographie de scaffolds et ensuite alignés à un génome de référence pour l'identification des certaines régions d'intérêt dans le génome, comme les marqueurs génétiques. Le génome complet nécessite donc des opérations de séquençage (Figure 1.7) (Green, 2001).

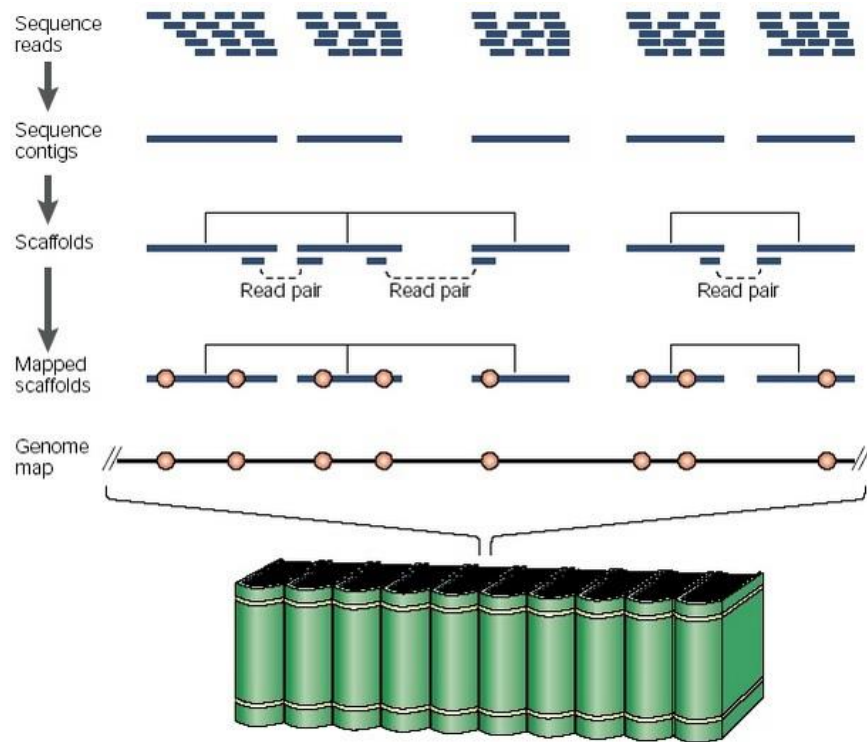


Figure 1.7 : Séquençage du génome complet d'après Green 2001.

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Compte tenu l'importance et la complexité de *V. dahliae* comme premier agent pathogène dans le complexe du PED, la variation en agressivité entre les isolats, leur reproduction clonale et le peu d'information connues sur le territoire canadien, il est nécessaire d'étudier la diversité génétique des populations de *V. dahliae* afin de mieux comprendre le complexe PED. Mon hypothèse est qu'il est possible de trouver des différences dans la diversité génétique et dans l'agressivité des souches de *V. dahliae* pouvant causer le PED provenant de différentes provinces canadiennes.

Mon projet a eu pour but de:

1. Isoler les souches de *V. dahliae* causant le PED dans 6 provinces canadiennes
2. Caractériser les souches de *V. dahliae* causant le PED dans 6 provinces canadiennes, au niveau de leur:
 - a. Diversité génétique des populations (SNPs).
 - b. Groupes de compatibilité végétative (VCG).
 - c. Agressivité grâce à l'expression de symptômes.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1. Échantillonnage du sol

L'échantillonnage du sol a été effectué dans les champs commerciaux de pommes de terre des principales régions de culture de pomme de terre des provinces de l'Alberta, le Manitoba, l'Ontario, le Québec, le Nouveau-Brunswick et l'Île-du-Prince-Édouard, dans les années 2019 et 2020. Les échantillons ont été prélevés à l'automne de la saison de croissance précédant la rotation de pommes de terre. Cette période d'échantillonnage reflète le moment où les producteurs échantillonnent généralement le sol pour évaluer la présence d'agents pathogènes en laboratoire et prendre une décision de gestion pour la culture de pommes de terre en fonction d'une évaluation du risque de perte de rendement due au PED. Pour chaque champ, 40 carottes de sol jusqu'à 25 cm de profondeur ont été collectées à l'aide d'une tarière hollandaise de 6 cm de diamètre le long d'un parcours en « W ». Le sol des carottes d'un champ a été placé dans un seau, mélangé, mis en sac, placé sur la glace et amené aux laboratoires du Centre de recherche et de développement de Saint-Jean-sur-Richelieu et réfrigéré à 4°C (Figure 3.1).

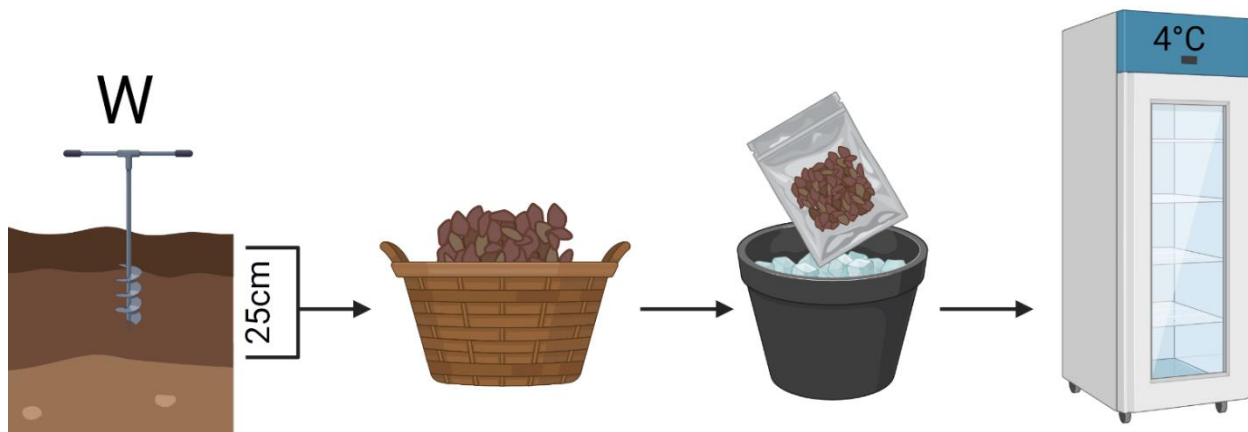


Figure 3.1 : Schématisation de l'échantillonnage, mis en sac et conservation des échantillons du sol (Créé avec Biorender.com).

3.2. Subérisation des semis

Des sections des tubercules de pomme de terre du cultivar Russet Burbank d'environ 2 cm ont été coupées en gardant sur chaque morceau un germe (ou œil) et en priorisant les germes opposés à la zone d'attachement du tubercule à la racine dans une zone désinfectée préalablement. Ensuite, les tubercules coupés ont été placés sur du papier absorbant dans une caisse bien aérée et conservés sous la lumière à 15°C, 70% HR pendant 72 heures. Une fois que la cicatrisation est bien solide et non collante les semis ont été prêtes pour être semés.

3.3. Cultures pièges pour l'isolation de *Verticillium dahliae*

Des sections des tubercules de pomme de terre subérisées du cultivar Russet Burbank ont été semés dans des pots de 15 cm avec 600 ml de substrat stérile autoclavé pendant 45 min sur deux jours consécutifs dans des sacs d'autoclave (mélange de terre noire / sable horticole (2 :1)) + 300 ml de sol autoclavé + 300 ml de sol échantillonné dans chambres de croissance avec une photopériode de 16h le jour à 23°C et 18°C la nuit (Figure 3.2). Les pots ont été arrosés aux deux jours avec 100 ml d'eau pour maintenir l'humidité du sol (environ 80% de capacité de rétention d'eau pour favoriser la croissance de *Verticillium*). Une fois que les tubercules ont émergé, la fertilisation (20:20:20) a été réalisée chaque deux semaines pendant deux mois.



Figure 3.2 : Culture piège de pomme de terre du cv Russet Burbank dans le substrat mélangé avec échantillons du sol des provinces participatives.

3.4. Isolation des *V. dahliae*

À deux mois de croissance, les tiges des plantes au-dessus du sol ont été coupées (5 – 6 cm environ). Sous la hotte, elles ont été stérilisées à la surface dans 3 bains consécutifs de 1 min d'eau de javel (diluée à 1 :10), éthanol 95% et H₂O distillée autoclavée, suivi d'un séchage de 5 min sur papier autoclavé stérile. Lorsque les tiges ont séché, 3 tranches ont été coupées (bas, milieu et haut) et ensuite transférées sur un milieu potato dextrose agar (PDA DIFCO TM - 39 g de PDA et 0,1 g de streptomycine - sulfate dans 1 L d'eau distillée) dans une boîte de Petri, en déposant les tranches dans le sens des aiguilles d'une montre (à égales distance) afin de pouvoir associer les tranches à la hauteur de la tige. Ensuite, les boîtes de Petri ont été incubé à 23°C, 70% RH, sans lumière, pendant deux semaines (Figure 3.3 et 3.4).

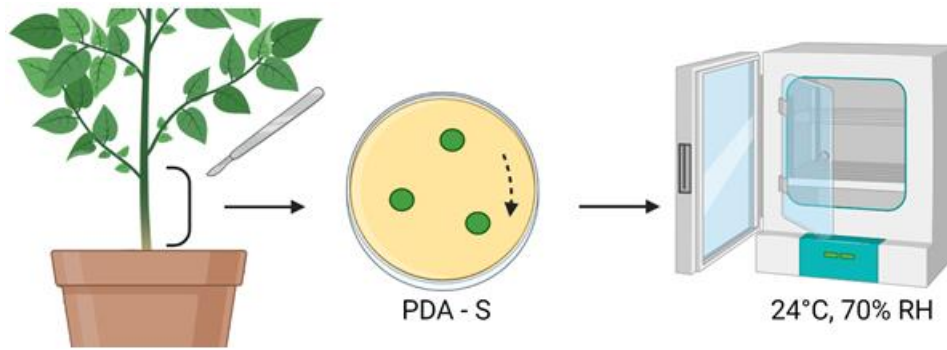


Figure 3.3 : Isolation de *V. dahliae* à partir de tiges des plantes pièges (Créé avec Biorender.com).



Figure 3.4 : *V. dahliae* isolés à partir de tiges sur milieu PDA avec streptomycine.

3.4.1. Obtention de cultures pure de *V. dahliae*

Après deux semaines d'incubation, à l'aide d'un binoculaire les colonies qui présentaient des verticilles ont été sélectionné. Sous la hotte, des carrés de mycélium ont été transférés sur le milieu semi-sélectif NP-10 de Sorenson (Préparation de deux bouteilles pour 1 L de NP-10. Bouteille A : 5,0 g d'acide polygalacturonique, sel orange de Na de qualité SIGMA (P-3889), 1,2 g de pastilles de NaOH (0.025 N) et 500 ml d'eau distillée. Bouteille B : 15 g d'agar, 1,0 g de KNO₃, 1,0 g KH₂PO₄, 0,5 g de KCl, 0,5g de MgSO₄ x 7H₂O, 0,5 ml de Tergitol NP-10 et 500 ml d'eau distillée. Les bouteilles ont été stérilisées individuellement avant d'ajouter les antibiotiques suivants à la bouteille B : 0,5 g de Chloramphenicol, 0,5 g de Streptomycin – sulfate et 0,5 g de Chlortetracycline hydrochloride. Ensuite, les bouteilles A et B ont été mélangées (Kabir *et al.*, 2004)) dans une boîte de Petri et incubés à 23°C, 70% RH, sans lumière, pendant deux semaines (Figure 3.5). Le milieu semi-sélectif NP-10 a été utilisé pour favoriser la production de micro-sclérotés, l'identification et sélection des *V. dahliae*.

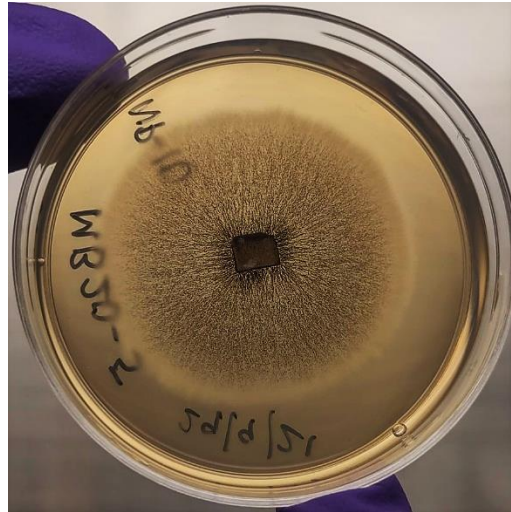


Figure 3.5 : *V. dahliae* et micro-sclérotos sur milieu NP-10.

3.4.2. Cultures isogéniques monosporiques

Des isolats isogéniques purs de *V. dahliae* ont été obtenus à partir d'un transfert d'une seule conidie. Pour cela, des carrés de mycélium (environ 4 – 5) ont été suspendus dans 4 ml d'eau distillée autoclavée afin de créer une solution des spores. Ensuite, 10 μ L de la suspension ont été mis sur un hématimètre pour réaliser le comptage des spores et puis la solution a été diluée jusqu'à 10^{-4} ou 1000 conidies /mL. Huit gouttes de 15 μ L ont été mis sur un milieu agar-eau (WA) composé de 20 g d'agar dans 1 L d'eau distillée dans une boîte de Petri, pour favoriser la germination des spores. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 23°C, 70% RH, sans lumière, pendant 24 h. Après incubation, les boîtes de Petri ont été observées à l'aide d'un microscope à 400X sous la hotte et une conidie a été transférée sur un milieu PDA DIFCO TM (39 g de PDA dans 1 L d'eau distillée) sans antibiotique et incubé à 23°C, 70% RH, sans lumière, pendant deux semaines (Figure 3.6).

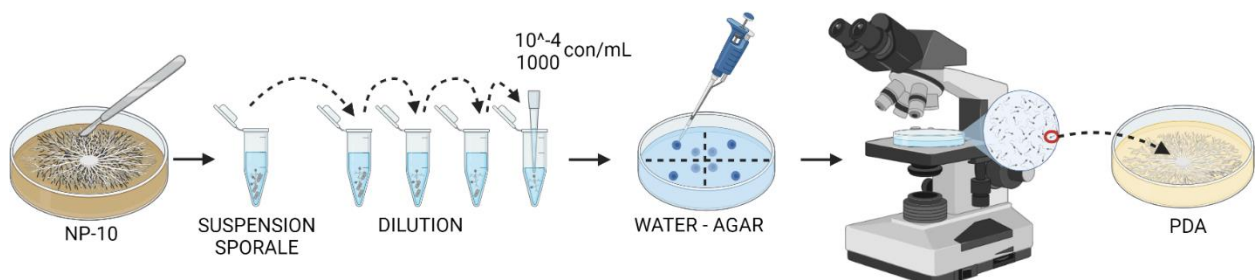


Figure 3.6 : Schématisation de la méthodologie pour l'obtention d'une spore de *V. dahliae* et la production de cultures isogéniques monosporiques (Créé avec Biorender.com).

3.5. Analyse moléculaire

3.5.1. Préparation du matériel

Le mycélium des cultures monosporiques de *V. dahliae* a été transféré dans des boîtes de Petri sur le milieu PDA recouvert d'une rondelle de cellophane (Innova cellophane 500 - préalablement stérilisées dans une boîte de Petri en verre, chaque rondelle de cellophane ayant été séparée avec une rondelle de papier). Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 23°C, 70% RH, sans lumière, pendant 3 semaines. Après incubation, tout le mycélium a été récolté et transféré dans tubes Eppendorf de 2 ml. Les échantillons ont été congelés à -80°C et ensuite, lyophilisés dans un lyophilisateur Labconco Freezone 6L à -50°C pendant 24 heures ou le temps nécessaire pour que les échantillons ne contiennent plus de glace (Figure 3.7).

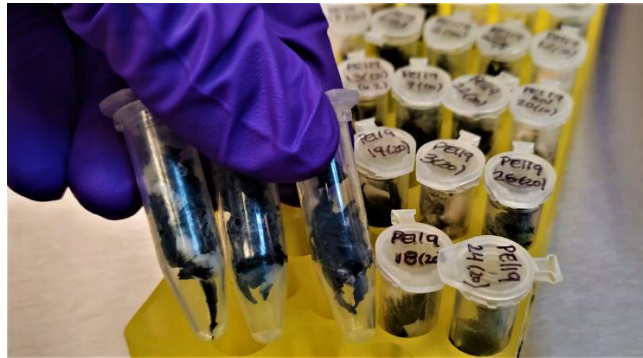


Figure 3.7 : Mycélium de *V. dahliae* lyophilisés.

3.5.2. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait avec la trousse d'extraction DNeasy Power Soil Pro de Qiagen, en utilisant 0,01 g de mycélium lyophilisé et en suivant le protocole d'extraction de Qiagen. La qualité de l'ADN a été vérifiée par spectrophotométrie (NanoDrop) et par fluorimétrie (Qubit). La concentration d'ADN a été ajustée à minimum de 5 ng/μl avant d'être envoyé pour le séquençage.

3.5.3. Séquençage

L'ADN extrait a été ensuite envoyé pour le séquençage du génome complet shotgun ou « whole genome sequencing » (WGS) shotgun (Illumina NovaSeq 6000 S4 PE150 Sequencing lane) au Centre d'expertise et de services de Génome Québec, Montréal, Canada.

3.5.4. Traitement des données, appel de variantes et contrôle de qualité

Le contrôle de qualité pour les données de séquençage en format FASTQ a été réalisé avec l'outil Fastp v0.23.2 (Shifu *et al*, 2018). Ensuite, les séquences ont été alignées sur le génome de référence de *V. dahliae* VdLs.17 (accession GenBank GCA_000150675.2) (Klosterman *et al*, 2011) avec le logiciel d'alignement BWA v0.7.17 (Li H. et Durbin R., 2009) avec les paramètres par défaut. Samtools v 1.15 a été ensuite utilisé pour trier le fichier. L'appel de variantes pour produire un fichier *Variant Calling Format* (VCF) a été fait avec freebayes v1.3.6 (Garrison et Marth, 2012) avec les paramètres suivants: --min-alternate-fraction 0.2, --use-best-n-alleles 4, --min-alternate-total 30, --min-alternate-count 5, --min-coverage 500. Les variantes dans le génome (SNP) ont ensuite été filtrées pour qualité avec QUAL à l'aide du package vcfR (Knaus et Grünwald, 2017) en R 4.0.3 (R-studio v.1.3.1093).

3.5.5. Différentiation génétique et structure des populations de *V. dahliae*

Les données ont été organisées en fonction des 6 provinces évaluées. Pour mettre en évidence les relations phylogénétiques un arbre des distance génétiques a été fait à l'aide du package R ggtree (Yu, 2020), avec une distance génétique nei.dist, puis la validation de robustesse des embranchements a été fait par Bootstrapping . Ensuite, pour déterminer la structure des populations de *V. dahliae*, une analyse en composantes principales (PCA) a été réalisé à l'aide du package R ade4 et la fonction dudi.pca avec une matrice de fréquences d'allèles calculée avec la fonction scaleGen (Dray et Dufour, 2007).

3.5.6. Analyse statistique

Une analyse de variance moléculaire (AMOVA) a été fait en utilisant poppr.amova à l'aide du package R ade4 (Dray et Dufour, 2007) pour mieux comprendre le pourcentage de variation entre les populations de *V. dahliae*. Ensuite, un test de permutation de Monte-Carlo a été fait.

3.5.7. Caractérisation en groupes de compatibilité végétative de *V. dahliae*

Afin d'associer les population de *V. dahliae* obtenues aux groupes de compatibilité végétative à l'aide d'un analyse phylogénétique, le fichier VCF utilisé de la section 3.5.4 ainsi que le fichier VCF de la publication de Bautista *et al*. 2020 (https://github.com/laurabau/BautistaJalon_Vdahliae) ont été fusionnés avec bcftools (Danecek P, 2021) en prenant seulement les variantes communs entre les deux VCF. Le fichier VCF de Bautista *et al*. 2020 a été choisi en raison du faible disponibilité des bases de données des marqueurs moléculaires par SNP liés au VCG. Afin d'alléger et de simplifier le processus, nous avons conservé

seulement le premier chromosome (CP010980.1). Le VCF résultant a été transformé en objet genind (package adegenet) à l'aide de la fonction vcfR2genind (package vcfR). Ensuite nous avons construit un arbre phylogénétique à l'aide de la fonction aboot (package poppr) pour associer les échantillons aux groupes de compatibilité identifiés dans la publication de Bautista *et al.* 2020.

3.6. Test d'agressivité

3.6.1. Préparation de l'inoculum de *V. dahliae*

L'inoculum fongique a été préparé à partir d'une culture de *V. dahliae* d'une seule conidie sur PDA pendant 3 semaines. De l'eau distillée stérile (3ml) a été ajoutée à la surface de la gélose avec le champignon et ensuite grattée pour libérer les spores. Cette suspension des spores résultante a été ajustée à une concentration de 1×10^6 conidies/ml (Burpee et Bloom, 1978).

3.6.2. Matériel végétal et conditions de croissance

Des sections des tubercules de pomme de terre subérisées de cultivar Russet Burbank ont été ensemencés dans des pots de 15 cm avec 1200 ml de substrat stérile (mélange de terre noire / sable horticoles (2 :1)) dans des chambres de croissance avec une photopériode de 16h le jour à 23°C et 18°C la nuit. Les pots ont été arrosés à chaque deux jours avec 100 ml d'eau pour maintenir l'humidité du sol (environ 80% de capacité de rétention d'eau pour favoriser la croissance de *V. dahliae*). Une fois que les tubercules ont émergé, la fertilisation (20:20:20 NPK) a été réalisée chaque deux semaines pendant deux mois.

3.6.3. Inoculation de *V. dahliae* et évaluation de la pathogénicité

Trois semaines après l'émergence des plantes, les pots ont été inoculé avec 10 ml de la suspension de spores. La suspension a été versée dans quatre trous de 6 cm de profondeur générés par une pipette à 5 cm de distance de la tige (Uppal *et al.*; 2007). Les plantes ont été évaluées pendant 7 semaines pour l'apparition et la gravité des symptômes de PED (flétrissement, chlorose et nécrose), une évaluation du pourcentage d'infection et la décoloration vasculaire de la partie basale des tiges a été effectué. Le pourcentage d'infection a été calculé avec la formule 1, où IL est le nombre de feuilles présentant symptômes externes de PED, et TL est le nombre total de feuilles dans la plante évaluée (Gauhl *et al.*, 1993).

$$\text{Pourcentage d'infection} = \left(\frac{IL}{TL} \right) \times 100$$

(1)

Les valeurs de pourcentage d'infection ont ensuite été converties en aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) (Madden et al. 2007) a été calculée à l'aide du package R agricolae (Mendiburu et Yaseen, 2020), en suivant la formule 2, où N est le nombre total d'évaluations faites en semaines, Y_i est le pourcentage d'infection de la maladie à la $i^{\text{ème}}$ semaine d'évaluation, et $t_{i+1} - t_i$ est le temps entre deux évaluations. L'agressivité des isolats se manifestait par une augmentation des valeurs AUDPC.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

(2)

Les symptômes de PED internes ont également été déterminés en utilisant une échelle visuelle de 0 à 5 basée sur le pourcentage de décoloration vasculaire dans les tiges des plantes (Tableau 3.1 et Figure 3.8) proposé par Alkher *et al.*, (2009). Étant un échantillonnage destructif, cette mesure a seulement été évaluée à la fin de l'expérience (semaine 7).

3.6.4. Dispositif expérimental et analyse statistique

L'essai a suivi un dispositif expérimental en randomisation totale, avec 7 isolats de *V. dahliae* et 6 répétitions. Des différences significatives entre les isolats de *V. dahliae* dans termes de l'AUDPC total pour le pourcentage d'infection, et la décoloration vasculaire ont été déterminée par analyse de la variance (ANOVA) suivi d'une comparaison des moyennes entre les souches de *V. dahliae* à l'aide du test Tukey HSD ($P < 0,05$).

Tableau 3.1 : Conversion de pourcentage de sévérité du PED sur le feuilles et tiges de pomme de terre (d'après Alkher *et al.*, 2009).

Score	Pourcentage de décoloration interne de la tige
0	Absence de coloration vasculaire (VD)
1	Traces à <9% VD
2	10 à 24% VD

3	25 à 49%
4	50 à 74%
5	75–100%



Figure 3.8 : Échelle visuelle de la progression du PED sur les feuilles et tiges de pomme de terre (Adaptation de Alkher *et al.*, 2009).

4. RÉSULTATS

4.1. Isolement de *Verticillium*

Les isolement de *Verticillium* ont été faites à partir de cultures pièges de pommes de terre avec des échantillons de sol récoltés en 2019 et 2020. Dans la plupart des provinces, environ 30 pots ont été ensemencés en fonction du nombre d'échantillons reçu par année. Les premiers symptômes de la maladie sont apparus en même temps que les premières fleurs (chlorose de feuilles). Les provinces avec un pourcentage plus élevé de succès d'isolation moyennes des *Verticillium* entre les deux années évaluées ont été le Nouveau-Brunswick (NB) avec 78 % et l'Île-du-Prince-Édouard (PEI) avec 70,5 %, et ensuite pour les provinces de l'Alberta (AB), le Québec (QC), l'Ontario (ON) et le Manitoba (MB) le pourcentage varie entre 30 à 50 %. L'année 2019 a présenté un pourcentage de succès d'isolation plus élevé comparé à l'année 2020 pour la plupart des provinces participatives sauf pour l'ON avec 30 % en 2019. (Figure 4.1). Un total de 192 isolats de *Verticillium* ont été obtenus dans les provinces participantes, PEI et NB présentant un nombre d'isolats plus élevé de 63 et 51 isolats respectivement (Tableau 4.1).

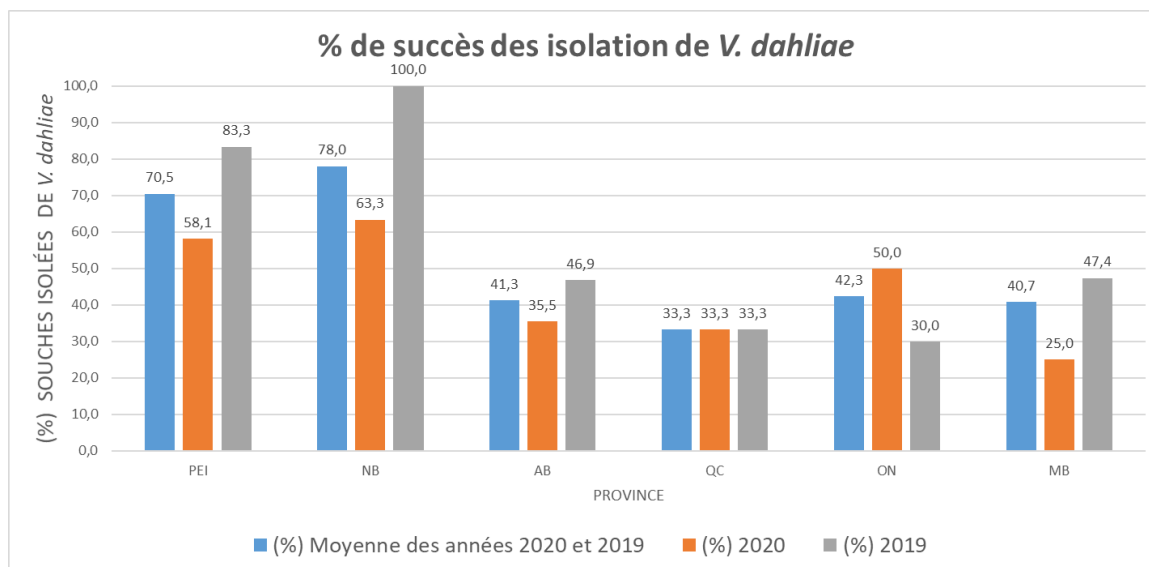


Figure 4.1 : Isolement de *V. dahliae* en 2019 et 2020 dans les 6 provinces participatives.

Tableau 4.1 : Quantité d'isolats obtenus de *Verticillium* par province

Province	Nombre d'isolats obtenus
L'ILE-DU-PRINCE-ÉDOUARD (PEI)	63

NOUVEAU-BRUNSWICK (NB)	51
ALBERTA (AB)	26
QUÉBEC (QC)	19
ONTARIO (ON)	22
MANITOBA (MB)	11
TOTAL	192

Ensuite, 192 cultures pures (monosporiques) de *Verticillium* ont été faites, les colonies mycéliennes présentaient des morphologies diversifiées de coloration blanche, grise ou noire (pour la présence de micro-sclérotés), d'aspect épais et duveteuse, avec marges définies. Sous le binoculaire, il a été possible d'observer des verticilles qui sortaient du mycélium et des conidies hyalins qui possédaient une forme circulaire (Figure 4.2).

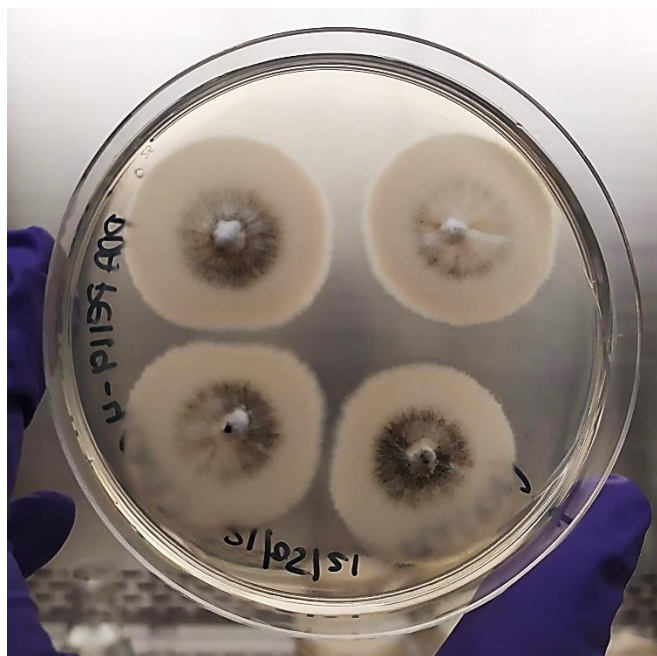


Figure 4.2 : Cultures de *V. dahliae* à partir d'une seule spore sur PDA.

4.2. Identification de *V. dahliae*, génotypage et appel de variantes SNP

Afin d'étudier la diversité génétique des isolats obtenus dans les 6 provinces canadiennes, le génome de 192 isolats de *Verticillium* ont été séquencés. Les séquences ont ensuite été alignées sur le génome de référence de *V. dahliae* (Vd.Ls.17) et une séquence supplémentaire de *V. alfalfae* (VaMs.102) a été utilisée comme contrôle négatif. L'analyse phylogénétique a montré que toutes les séquences des isolats obtenues s'alignaient à > 95% sur le génome de référence Vd.Ls.17, tandis que la séquence supplémentaire VsMs.102 s'alignait juste à 18% de ce génome de référence. Ce qui a permis de confirmer que toutes les séquences des isolats appartenaient à l'espèce *dahliae*. Dans la Figure 4.3, on peut trouver deux clades distinctes séparées parmi toutes les séquences du projet (en rouge) et la séquence supplémentaire de *V. alfalfae* (en vert).

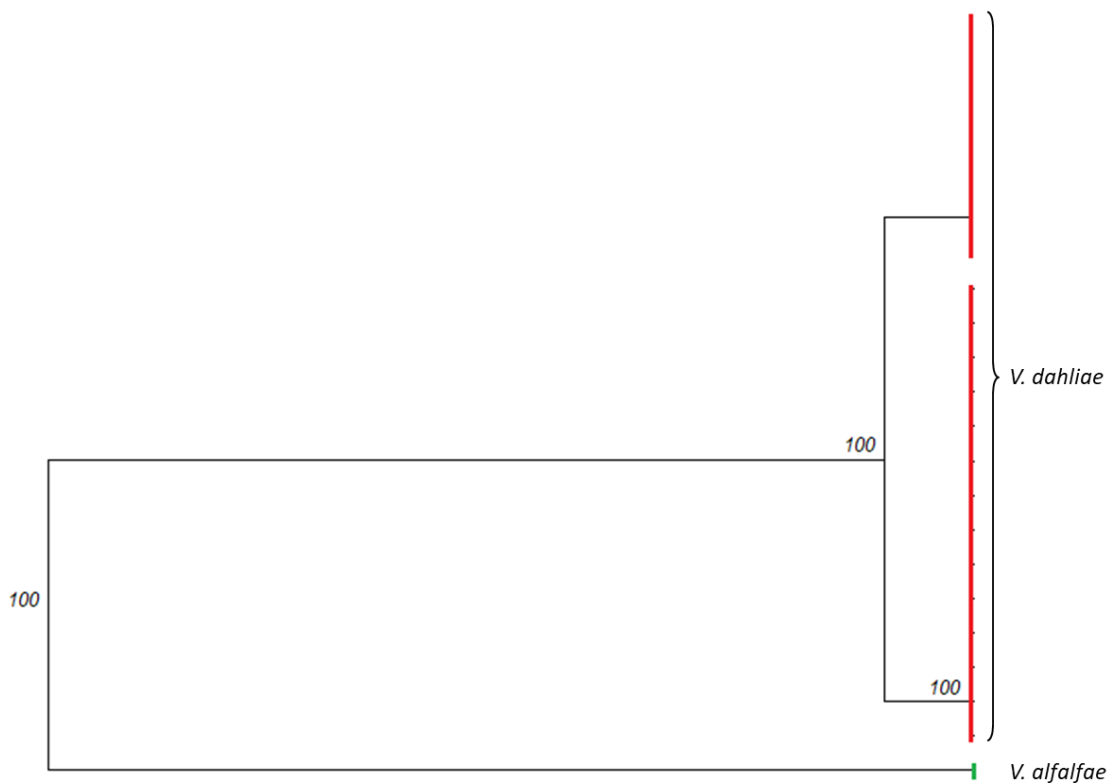


Figure 4.3 : Analyse phylogénétique pour l'identification de *V. dahliae* .
Distance utilisée nei.dist et validation de robustesse des embranchements par bootstrap.

Ensuite, après l'assemblage sur le génome de référence de *V. dahliae* , un total de 13,1 M lectures (« reads ») par échantillon ont été trouvées avec une couverture de 90X. Puis, un nombre total de 259 497 SNP bruts repartis dans le génome de 192 isolats de *V. dahliae* ont été obtenues (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Base de données de séquençage du génome complet des isolats obtenues de *V. dahliae*

Type of séquençage	Whole genome sequencing shot gun Illumina NovaSeq 6000 S4 PE150 Sequencing lane
(%) mapping sur le génome de référence <i>Verticillium dahliae</i> Vd.Ls.17	> 95%
Reads/échantillon	13,1 M
Couverture	90X
Nombre de variantes VCF (CanPEDnet)	259 497
Nombre de variantes VCF (Bautista <i>et al.</i>, 2020)	26 934
Nombre de variantes VCF pour VCG	25 928

4.3. Analyses phylogénétiques

4.3.1.Par SNP

Pour les analyses phylogénétiques, un sous-échantillonnage de 5 000 SNP non filtrées des séquences obtenues ont été choisis afin de réduire le temps de calcul, suivi du filtrage par qualité 1,6% des variantes ont été supprimées, résultant en 4 370 SNP retenues. Ensuite un arbre phylogénétique a été fait pour voir la distance génétique entre les séquences obtenues, ce qui a mis en évidence deux clades principales (Figure 4.4) qui étaient séparées par une longueur de branche plus longue, donc, les séquences sont différentes entre elles. Elles ont été identifiées comme étant deux lignées clonales : lignée 1 (en rouge) et lignée 2 (en bleu).

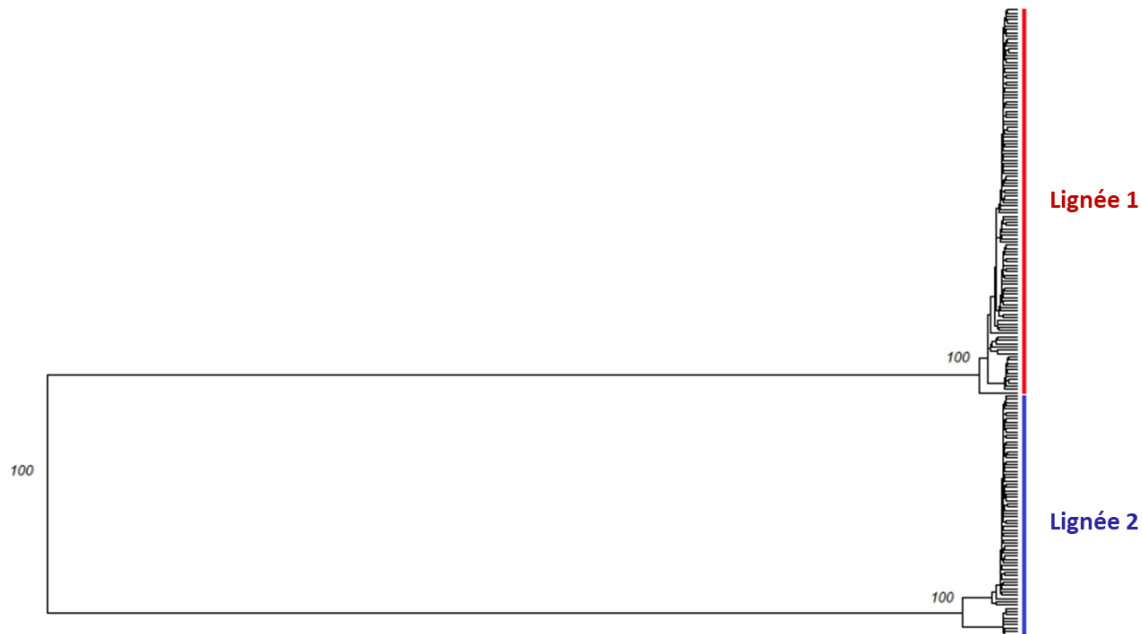


Figure 4.4 : Analyse phylogénétique pour le regroupement des séquences de *V. dahliae* à partir de variantes en SNP trouvées dans le génome de chaque isolat.

Distance utilisée nei.dist et validation de robustesse des embranchements par bootstrap.

Ensuite une analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée afin de regrouper les séquences et connaître dans quelle lignée étaient situés chaque province participante. La première composante représentait à elle seule plus de 90 % de la variance, raison pour laquelle dans l'analyse seulement l'axe 1 a été pris en compte pour l'analyse (Figure S1). Dans la figure 4.5, les séquences ont été séparées dans deux groupes, à droite (en rouge) la lignée 1 avec un total de 74 isolats et à gauche la lignée 2 (en bleu) avec un total de 118 isolats. Ce résultat a mis en évidence que les deux lignées sont prédominantes dans toutes les provinces du Canada et il y a un plus grand nombre d'isolats provenant des provinces de l'Est, donc NB, PEI et QC qui se retrouvaient dans le lignée 2 (Tableau 4.3).

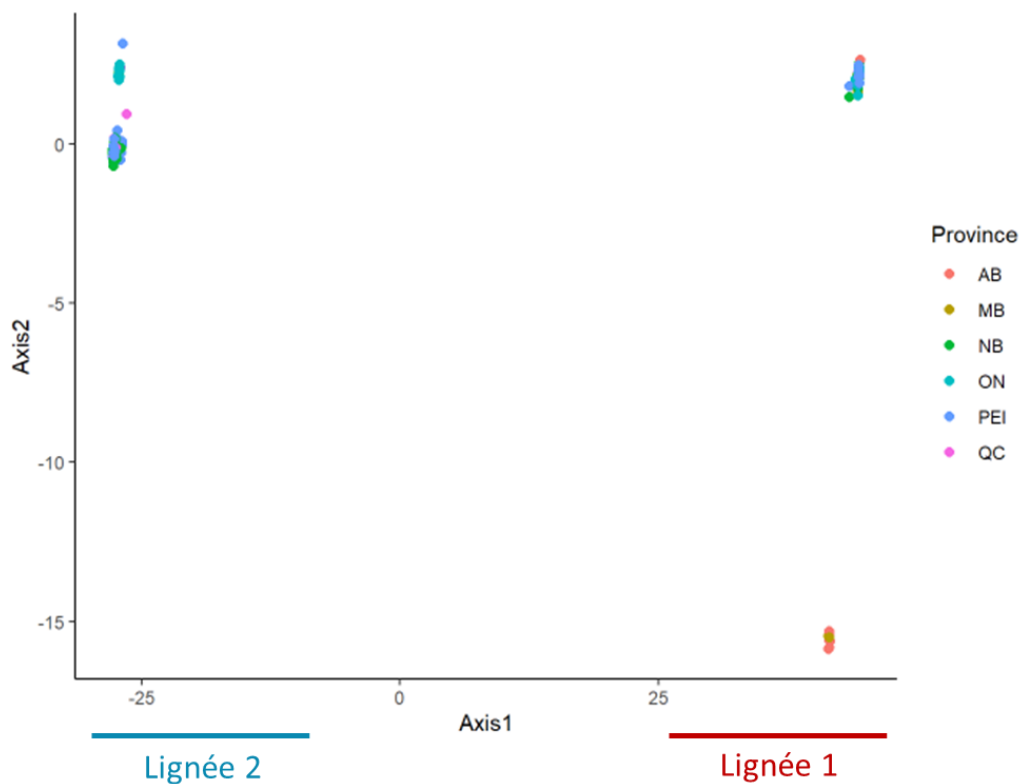


Figure 4.5 : Analyse en composantes principales des variantes en SNP du génome des isolats de *V. dahliae*.

Tableau 4.3 : Nombre d'isolats correspondant à chaque lignée clonale.

Province	Lignée 1	Lignée 2
AB	24	2
MB	10	1
ON	14	8
NB	10	41
PEI	15	48
QC	1	18

4.3.2. Analyse statistique

Ensuite, une analyse d'AMOVA a été faite pour trouver où se retrouvait la source de variabilité génétique dans les populations. Cette analyse a révélé que la source de variabilité génétique était principalement entre les lignées avec un pourcentage de variation de 96,81%, donc les populations étaient significativement différenciées comme lignées, contrairement au scénario où les populations sont étudiées de façon individuelle, et la diversité génétique est moins grande. Puis, un test de permutations de Monte-Carlo a été réalisé. L'hypothèse nulle de ce test est qu'il n'y a pas de différences significatives entre les populations d'une même lignée. Une valeur de $p = 0,001$ a été obtenue, donc l'hypothèse nulle a été rejetée, et il existe des différences significatives à l'intérieur de chaque lignée (Tableau 4.4).

Tableau 4.4 : Résultats d'un AMOVA effectué sur les variantes des séquences de *V. dahliae* obtenues dans toutes les provinces participatives.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme de carrés des écarts	Carrés moyens	Pourcentage de variation (%)
Entre lignées	1	234340,37	234340,37	96,81
Entre individus	190	16129,97	84,89	3,19
TOTAL	191	250470,33	1311,36	100
Test de Monte-Carlo				
Ho= il n'y a pas de différences significatives entre les populations d'un même lignée				
p-value: 0,001				

4.3.3. Lignée 1

Un arbre phylogénétique a été fait afin d'étudier les populations de la lignée 1. Deux sous-clades ont été retrouvés (Figure 4.6). Ensuite une analyse de PCA a été faite pour regrouper les séquences de façon similaire à l'analyse antérieure. Seule la première composante a été retenue (Figure S2) avec plus de 90% de la variation expliquée (l'axe 1 dans la figure 4.7). Deux groupes ont été trouvés. Le premier regroupement était présent dans toutes les provinces évaluées ($n = 65$), tandis que le deuxième regroupement était plus présent dans les provinces de l'Ouest du Canada tel que le Manitoba et l'Alberta ($n = 9$).

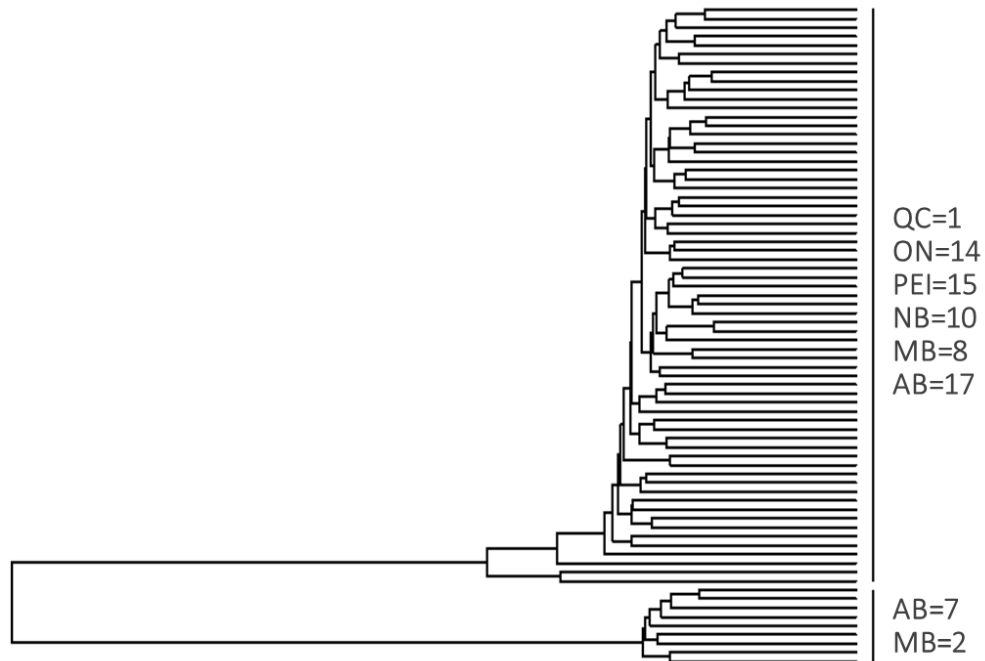


Figure 4.6 : Arbre phylogénétique créée à partir de la lignée 1.
Calculée par distance euclidienne et bootstrap.

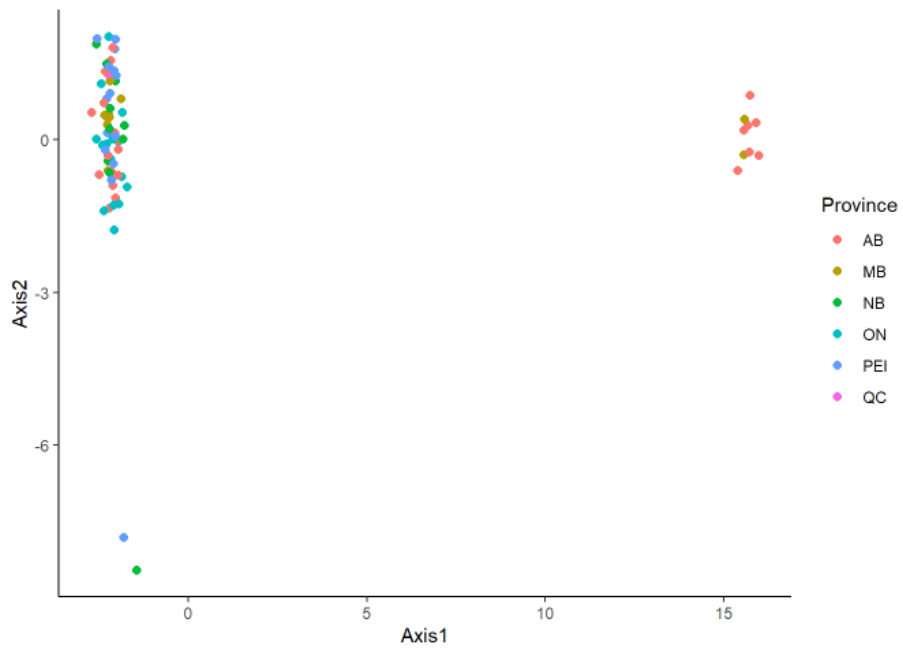


Figure 4.7 : Analyse en composantes principales de la lignée 1.
Calculée par distance euclidienne et bootstrap.

4.3.4.Lignée 2

Un arbre phylogénétique a été fait afin d'étudier les populations de la lignée 2. Toutes les séquences de cette lignée étaient présentes dans tous les provinces participantes et il a été possible d'identifier 4 clades (Figure 4.8). Une analyse de PCA a été aussi faite et les deux premières composantes ont été retenues. Quatre regroupements ont été retrouvés (Figure 4.9). Les séquences provenant du QC, PEI, et le NB ont été présentes dans les 4 groupes alors que les séquences du MB et de l'ON ont seulement été présentes dans deux groupes. Le structure de population pour cette lignée suggère un majeur nombre d'isolats qui appartiennent aux provinces de l'est du Canada.

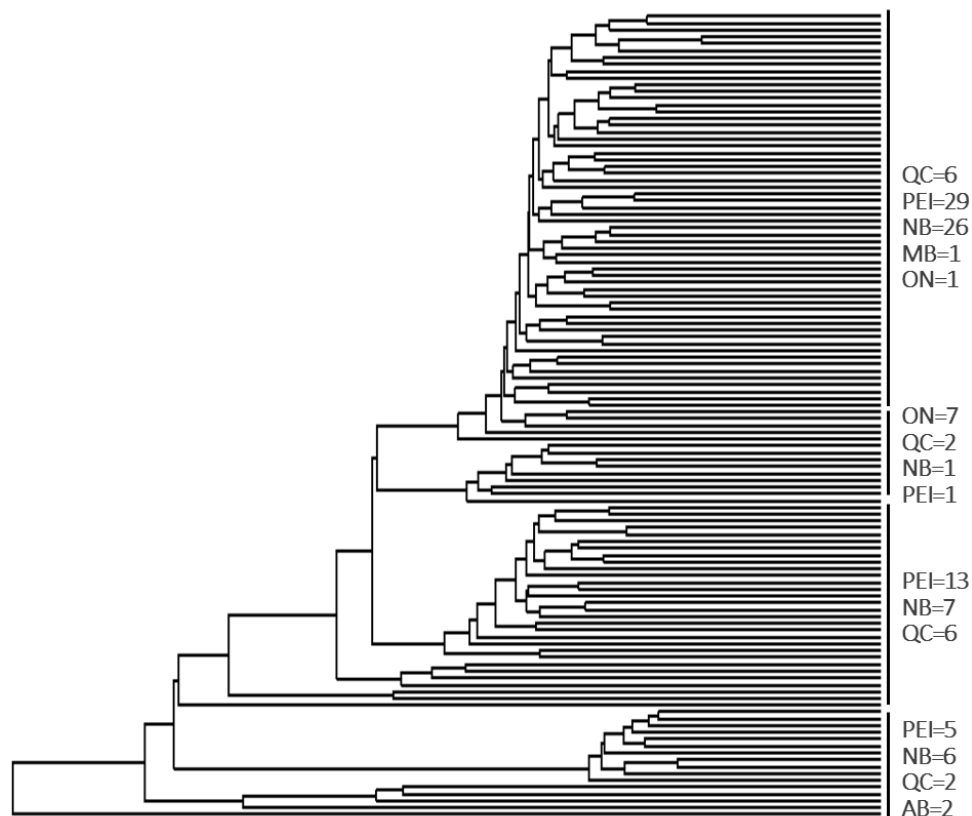


Figure 4.8 : Arbre phylogénétique créée à partir de la Lignée 2.

Distance utilisée nei.dist et validation de robustesse des embranchements par bootstrap.

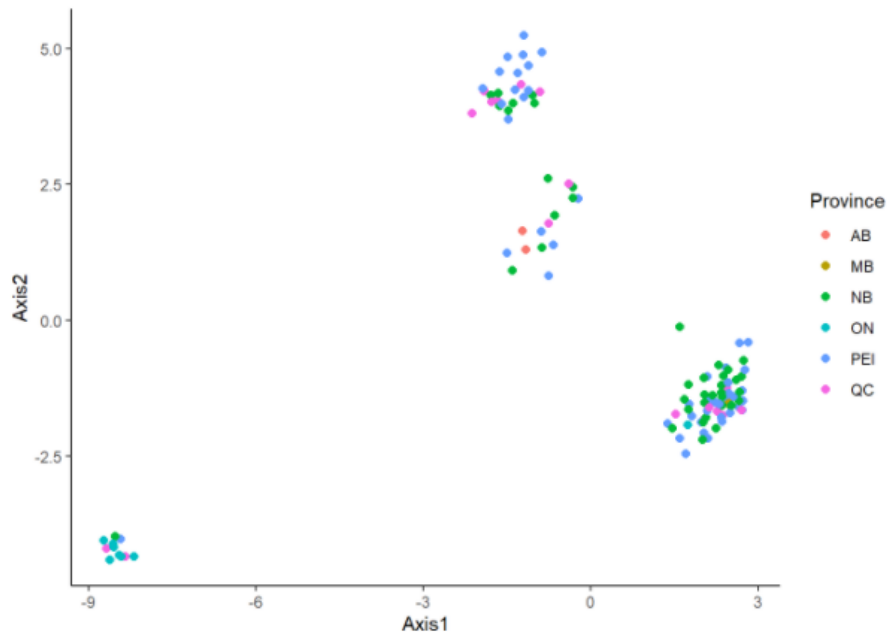


Figure 4.9 : Analyse en composantes principales de la lignée 2.

4.4. Classification des *V. dahliae* par VCG

Afin de classer les isolats de *V. dahliae* obtenus de toutes les provinces participantes en groupes de compatibilité végétative, un fichier VCF de Bautista *et al.*, 2020 avec 25 928 variantes (Tableau 4.2) a été fusionné avec le fichier VCF des isolats obtenus. Un arbre phylogénétique a été fait et 4 clades ont été identifiées comme appartenant soit au VCG 2A, 2B/1, 4A et 4B. Dans la Figure 4.10, les variantes qui appartiennent au VCG de Bautista *et al.*, 2020 sont identifiées en marron, puis les variantes des isolats obtenues dans cette étude sont identifiées en bleu. Toutes les variantes correspondant à la lignée 1 ont été associées au VCG 4A, alors que les variantes correspondant à la lignée 2 ont été associées au VCG 4B. Donc, les deux types de VCG sont présents dans toutes les provinces, mais il y a une plus grande quantité d'isolats VCG 4B qui proviennent de l'Est du Canada.

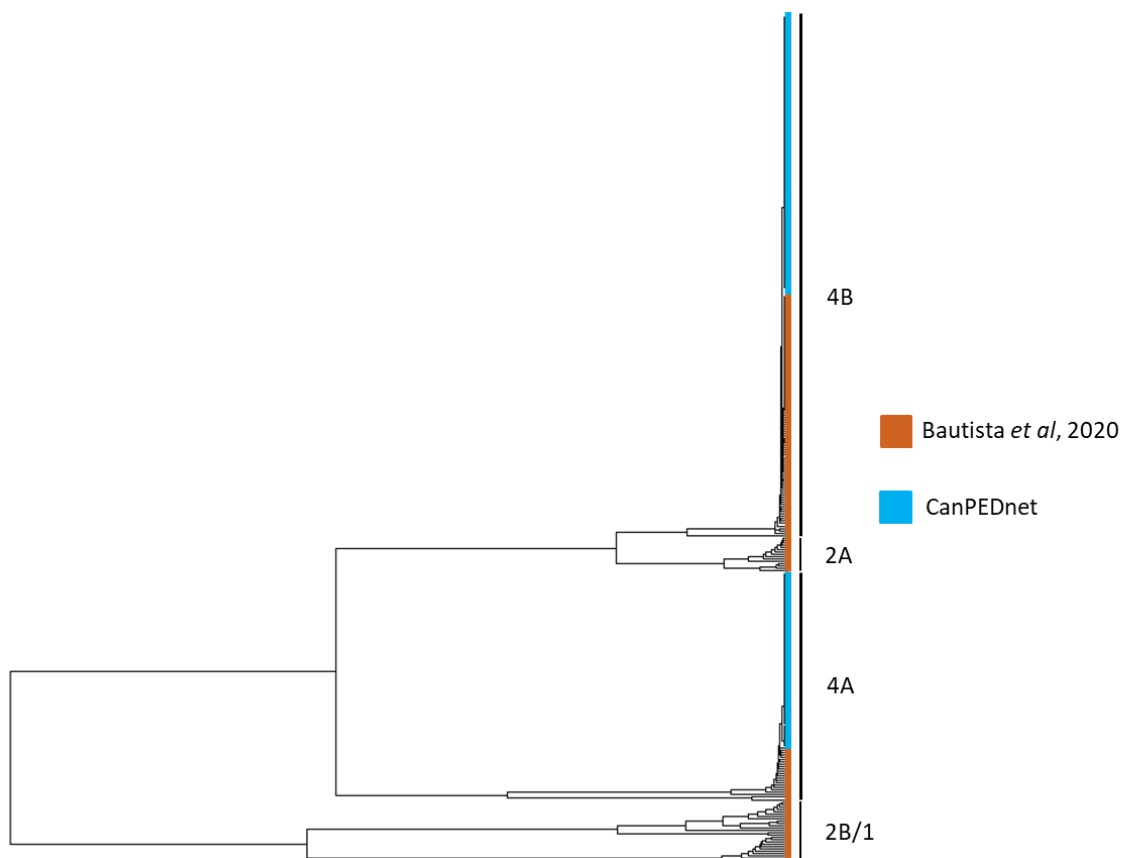


Figure 4.10 : Arbre phylogénétique créée avec les variantes communes entre Bautista *et al.*, 2020 et les isolats obtenues pour la classification de groupes de compatibilité végétative (VCG).

Distance utilisée nei.dist et validation de robustesse des embranchements par bootstrap.

4.5. Test d'agressivité

Un total de 7 souches de *V. dahliae* isolées des provinces AB (n=2, isolat 3 et 4), NB (n=1, isolat 3) et PEI (n=4, isolat 3, 10, 17 et 28) ont été choisis pour étudier des différences dans l'agressivité des isolats. Les isolats AB19-4 et PEI19-10 appartiennent à la lignée 1, et les isolats AB19-3, NB19-3, PEI19-(3,17,28) appartiennent à la lignée 2.

Ces souches ont été choisies dû à la forte présence du nématode racinaire *P. penetrans* dans les échantillons du sol (déterminé par l'équipe de B. Mimeo qui travaille en collaboration sur ce projet, cependant pour cet essais les populations des nématodes n'ont pas été utilisées). Des symptômes sont apparus dans les feuilles basales à partir de la 3^e semaine après l'inoculation et l'évaluation des symptômes s'est terminée à la semaine 7. Les plantes présentaient des symptômes de chlorose des feuilles basales qui continuaient de forme acropète et devenaient des feuilles nécrotiques au fil du temps.

Une ANOVA a été réalisée pour mettre en évidence les différences entre les moyennes d’AUDPC des isolats évalués. Donc, l’hypothèse nulle était qu’il n’y a pas des différences significatives entre les moyennes d’AUDPC des isolats. Une valeur p de 0.016 a été obtenue, donc l’hypothèse nulle a été rejetée, puisqu’il existe des différences significatives entre les moyennes d’AUDPC dans les isolats évalués. Ensuite, un test post-hoc de Tukey HSD a été réalisé, et il a été possible de trouver des différences significatives entre l’isolat NB19-3 et les isolats AB19-4, PEI19-3 et 17, en étant l’isolat du NB plus agressif avec un valeur d’AUDPC de 91.57 comparé aux valeurs de 20.25, 26.75, 25.73 pour les autres isolats respectifs. D’un autre côté, les isolats AB19-3, PEI19-10 et 28, n’ont pas présenté des différences significatives contre les autres isolats évalués (Figure 4.11).

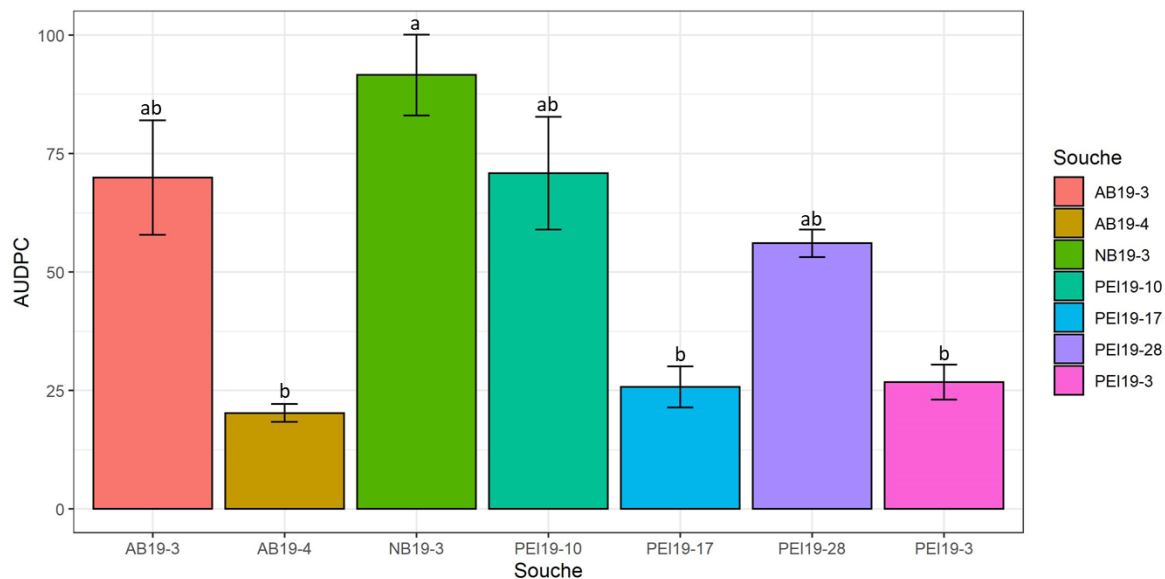


Figure 4.11 : Valeur d’AUDPC total basé sur le pourcentage d’infection des plantes de pomme de terre inoculées avec *V. dahliae*. Lignée 1 = AB19-4 et PEI19-10; Lignée 2 = AB19-3, NB19-3, PEI19-(3,17,28)

La décoloration vasculaire a été mesurée à la semaine 7 après l’inoculation. Une ANOVA a été effectuée, puis une valeur de p de 0.01 a été obtenue, donc il existe des différences significatives entre les moyennes de la décoloration vasculaire des isolats évalués. Suite au test post-hoc de Tukey HSD, il existe des différences significatives entre l’isolat PEI19-10 et les isolats AB19-3 et PEI19- 3 et 17. L’isolat PEI 19-10 étant plus agressif avec un score majeur qui représente une expression majeure des symptômes internes dans la plante. Puis, les isolats (NB19-3 et PEI19-28) n’ont pas présenté des différences significatives contre les autres isolats évalués (Figure 4.12).

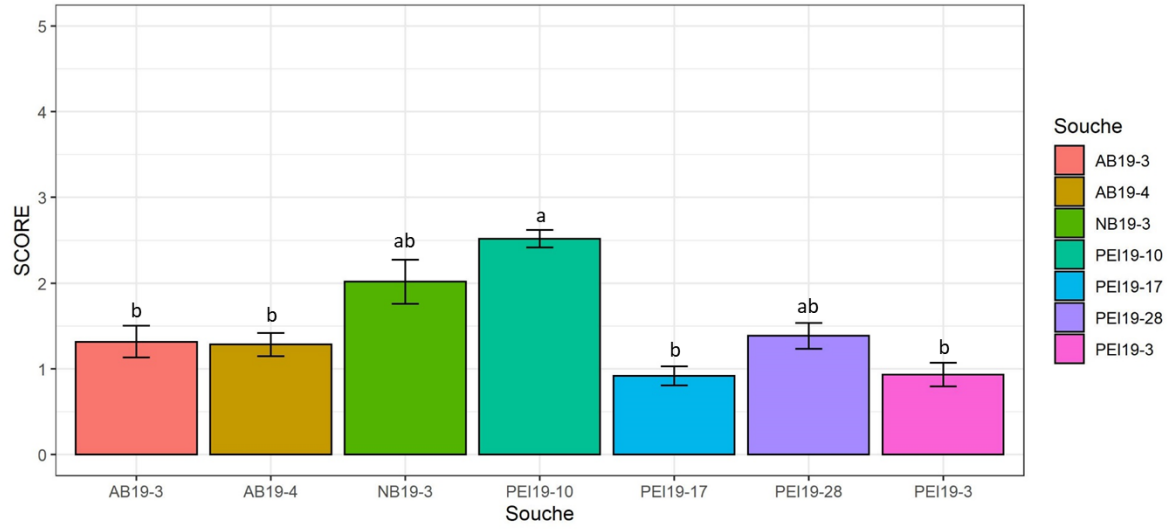


Figure 4.12 : Moyennes de la décoloration vasculaire de la partie basale, moyenne et supérieur des plantes de pomme de terre, 7 semaines après l'inoculation de *V. dahliae*. Lignée 1 = AB19-4 et PEI19-10; Lignée 2 = AB19-3, NB19-3, PEI19-3,17,28)

5. DISCUSSION

Dans la première partie du projet, l'objectif était d'isoler une grande quantité de souches de *Verticillium* dans des échantillons de sol provenant de 6 provinces canadiennes, afin d'étudier le complexe du PED. Un total de 192 souches pures ont été isolées, et l'identification morphologique nous a permis d'identifier un grand nombre de *Verticillium* spp. En comparant avec les résultats de Ashraf *et al* en 2012, morphologiquement, tous nos isolats ressemblaient principalement aux souches de *V. dahliae* dû à la présence de micro-sclérotés, avec une diversité dans la morphologie. Seule l'espèce *V. dahliae* a été isolée malgré l'existence de plusieurs espèces pouvant causer le PED partout au Canada. McKee et Thorpe en 2009, ont aussi trouvé une plus grande population de *V. dahliae* dans le sud-ouest de l'Ontario comparé à *V. albo-atrum* qui fait aussi partie du complexe PED. Une explication pour ceci est la capacité de *V. dahliae* à produire des microsclérotés, qui lui permet de survivre des années dans les sols, tandis que *V. albo-atrum* ne produit pas ces structures de survie et résiste moins bien à l'hiver; la principale source de propagation de cette espèce est à travers des semences infectées.

Comme mentionné, l'Île-du-Prince-Édouard et le Nouveau-Brunswick ont été les provinces avec le plus grand nombre d'isolats de *Verticillium* retrouvés. Ces résultats sont comparables avec Borza *et al* en 2017, qui rapportent une occurrence de 100% de *V. dahliae* dans les plantes de pomme de terre provenant de 10 régions différentes de l'Île-du-Prince-Édouard. Également, dans la province du Nouveau-Brunswick, une occurrence de *V. dahliae* de 90% à 92% a été rapportée dans des échantillons de printemps et d'automne (Chen *et al.*, 2022). Cette quantité élevée d'isolats retrouvés à l'Est du Canada peut être expliquée principalement par une plus grande superficieensemencée par des pommes de terre dans les provinces de l'Île-du-Prince-Édouard et du Nouveau-Brunswick (86 000 et 53 000 acres respectivement), qui est de deux à trois fois plus élevée que les autres provinces évaluées comme le Québec, l'Ontario et deux fois plus élevée que l'Alberta (STATCAN, 2021). Ce sont des provinces qui ont été appelées au cours des années à augmenter leur production grâce à une forte demande des produits transformés (tel que les frites, les pommes de terre rissolées, entre autres) tandis que les autres provinces du Canada, comme par exemple le Québec présentent une production plutôt destinée au marché frais, donc une plus petite superficie agricole est dédiée à la culture de la pomme de terre (McLaughlin, 2005).

Le Manitoba est aussi une des provinces avec une grande superficie de culture de pomme de terre, cependant durant nos expériences d'isolement de *V. dahliae*, elle a été la province avec la plus petite quantité d'isolats obtenus, en raison d'un plus petit nombre d'échantillons de sol reçus pendant les deux années d'essais. Il

est donc nécessaire de réaliser plus d'essais pour cette province. Dans les études réalisées par Borza *et al* en 2017 et Chen *et al* en 2022, l'abondance des populations de *V. dahliae* dans le sol peuvent varier d'une année à l'autre, en raison principalement de l'utilisation de produits chimiques pour la fumigation du sol et aussi de l'interdiction de la fumigation chimique au cours de la dernière décennie dans la province de l'Île-du-Prince-Édouard. En 2016, LaMondia a trouvé des baisses dans les populations de *V. dahliae* suite à l'utilisation de cultures de rotations dans le sol. Donc, ces activités utilisées de façon courante dans l'agriculture pour le contrôle et la protection des cultures peuvent expliquer la variation dans le nombre d'isolats obtenus par province. Ces premiers résultats suggèrent une distribution omniprésente de *Verticillium* capables d'infecter la pomme de terre dans toutes les provinces participatives.

Au niveau de l'étude des populations, dans la plupart des études réalisées sur le génome de *V. dahliae*, on retrouve souvent des analyses de populations associées principalement à des hôtes autres que la pomme de terre. Gurung *et al*, 2014 ont séquencé 329 isolats de *V. dahliae* chez la laitue. Ingram *et al.*, ont comparé le génome de 18 *V. dahliae* chez la tomate, Iglesias-Garcia *et al.*(2013) ont réalisé des analyses phylogénétiques en utilisant un groupe de 40 isolats de *Verticillium* provenant des hôtes comme l'épinard, le coton, la menthe, le poivron, la tomate, dont la plupart ont été identifiées comme étant *V. dahliae*. Les techniques de séquençage dans ces analyses ont souvent été l'utilisation de marqueurs de polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP), de marqueurs microsatellites ou de génotypage par séquençage (GBS) (Chen *et al.*, 2021). Cependant, il y a peu d'études du génome complet de *V. dahliae* principalement chez la pomme de terre et surtout au Canada, raison pour laquelle cette base de données avec le génome complet de 192 isolats de *V. dahliae* est d'une grande importance dans l'étude et la variabilité des populations de *V. dahliae*, et représente la première étude de ce genre au Canada.

La structure de population de *V. dahliae* a été un sujet de recherche important dans le dernier siècle. À l'aide des outils pour l'étude des populations, plusieurs descriptions ont été faites. Il a été possible de caractériser chez *V. dahliae* au moins 3 races en fonction de la réponse dans l'hôte et les symptômes exprimés, comme la présence/absence de la défoliation suite à une infection (Chen *et al.*, 2021). Nos résultats sont comparables avec Papaioannou *et al.*(2013), qui, grâce aux analyses phylogénétiques des régions d'espacement intergéniques, ont été capables de retrouver deux lignées clonales de *V. dahliae* dans 59 isolats qui provenaient des différents hôtes comme le coton, la tomate, le melon, l'aubergine, et quelques-uns de la pomme de terre, entre autres. Les souches ont aussi été isolées de différentes régions aux États-Unis et d'autres pays comme la Russie, la Turquie, la Grèce, etc. Milgroom *et al.*, en 2016, ont retrouvé 5 clades distinctes de 69 isolats de *V. dahliae* qui ont été principalement corrélées avec les origines

géographiques dans le bassin méditerranéen à l'aide des SNP obtenues par GBS. En Iran, il a aussi été possible d'identifier 2 clades séparées de 78 isolats de *V. dahliae* qui correspondaient à l'origine géographique (Centre et Nord-ouest d'Iran) et à l'hôte (Coton-Pistache et *Prunus* spp.) (Rafiei *et al.*, 2018). Donc, nos résultats nous permettent de montrer un nombre limité de lignées clonales en corrélation avec l'origine géographique. Ce nombre limité de lignées est peut-être due à la forte reproduction à partir de populations clonales (moins d'évènements de recombinaison dans le temps) du champignon présent.

La structure de population de *V. dahliae* a été aussi décrite par groupes de compatibilité végétative (VCG), qui sont souvent utilisés pour caractériser la pathogénicité des isolats (Wheeler, 2018). D'après les analyse phylogénétiques, deux VCG importants ont été associés à nos isolats, les VCG 4A et 4B. Ces résultats peuvent être contrastés avec Collado-Romero *et al.*, 2008, où des isolats qui provenaient de différentes origines (Espagne et Israël) et des lignées clonales différentes ont été classées dans des VCG, 2A et 4B. Cependant, il existe des contradictions. Plusieurs études ont démontré des incongruences dans les analyse phylogénétiques de VCG à partir de marqueurs moléculaires, où dans une même lignée clonale les isolats peuvent appartenir à deux VCG complètement distincts, séparés (Chen *et al.*, 2021; Jimenez-Gasco *et al.*, 2013). Ceci démontre l'importance de réaliser des tests *in vivo* pour la détermination de la compatibilité végétative, en utilisant la méthodologie de la production de mutants *nit* pour confirmer cette classification. Cette méthodologie, proposée par Joaquim et Rowe en 1990, consiste à produire des mutants *nit* générés à partir des sections de *V. dahliae* résistantes au chlorate de potassium, ensuite les mutants sont cultivés dans différentes sources d'azote (Nitrate de sodium, Nitrite de sodium, hypoxanthine, tartrate d'ammonium et Acide urique). Selon le milieu permettant une croissance, ils seront regroupés, et ensuite subissent un test de complémentation entre les mutants pour confirmer les groupes. Les mutants de chaque groupe seront croisés avec une souche de référence de VCG pour observer la compatibilité. De plus, des études sur l'agressivité des isolats en fonction de VCG sont conseillées, en raison de la présence du VCG 4A aux États-Unis qui a été rapporté comme étant plus agressif et causant une plus grande sévérité des symptômes foliaires pour la pomme de terre comparativement aux isolats du VCG 4B (Joaquim et Rowe, 1991).

En plus de l'utilisation des groupements par compatibilité végétative, plusieurs études ont identifié de nombreux gènes impliqués dans la pathogénicité chez *V. dahliae*. Par exemple, Zhou *et al.* (2012) ont identifié un ensemble de gènes (*NLPI* et *NLP2*) encodant des protéines capable de causer la nécrose et déclencher des réponses de défenses chez *Arabidopsis* et le coton. Liu *et al.*, en 2013 ont étudié le gène *VdsSSPI* qui code des protéines associées à la dégradation de la paroi cellulaire pour les lignées défoliantes. D'un autre côté, il y a d'autres études faites sur la réponse de gènes de défense à l'attaque par *V. dahliae* par le gène *Ave1* chez la tomate, ainsi que chez la pomme de terre avec les gènes de défense *PAL* et *PR*

(Jonge *et al.*, 2012; Derksen *et al.*, 2012). Cependant, les modèles sur les gènes impliqués dans la pathogénicité ont été faites dans la plupart des cas chez des plantes autres que la pomme de terre, celle-ci ayant été étudiée plus comme un modèle pour répondre aux questions des gènes impliqués dans la défense dans la plante en réponse d'une infection par *Verticillium*. Donc, notre base de données demeure un outil très important pour la poursuite de ces études en génomique et pour pouvoir potentiellement trouver des régions spécifiques dans nos lignées potentiellement corrélées à la virulence et l'agressivité, et mieux comprendre la complexité de *V. dahliae* dans le PED.

Finalement, des essais en conditions contrôlées ont permis de tester l'agressivité de 7 isolats de *V. dahliae*. Les postulats de Koch, décrits en 1887, ont été confirmés avec nos résultats. Tous les isolats ont été isolés de plantes malades, mises en culture pure, et ensuite inoculés dans des plantes saines, qui ont ensuite montré des symptômes, démontrant la capacité des isolats à réinfecter la pomme de terre (Mainil, 2005). Pour les isolats qui présentaient une plus grande agressivité, les symptômes sont apparus à partir de la semaine 3, tandis que pour les autres isolats l'apparition des symptômes a pris une ou deux semaines de plus. Une corrélation entre les isolats choisis et les deux lignées identifiées lors des analyses génétiques n'a pas été établie, mais ceci n'est pas surprenant vu le petit nombre d'isolats testés et la proportion inégale des deux lignées. Seulement deux isolats de la lignée 1 (PEI19-10 et AB19-4) ont été choisis contre 5 isolats de la lignée 2, ceux-ci ayant été sélectionnés pour la cooccurrence avec les nématodes lors de leur isolation des échantillons de sol, et non leur appartenance à l'une ou l'autre des lignées découvertes. Quelques observations ont été faites lors de ces tests. L'isolat NB19-3 a présenté une valeur plus élevée d'AUDPC, et on s'attendait que la décoloration vasculaire enregistré pour cet isolat soit la plus élevée, cependant c'était l'isolat PEI19-10 qui a eu le score le plus élevé. Alkher *et al.*, 2009 expliquent cette variation, la décoloration vasculaire est peut-être un des meilleurs marqueurs dans l'évaluation des symptômes, les évaluations des facteurs externes sont parfois surestimés vu que les symptômes causés par *V. dahliae* ressemblent aux symptômes causés par d'autres genres de stress (par exemple, une carence nutritionnelle ou un stress hydrique) dans la plante. Ils mentionnent aussi une légère diminution dans la décoloration vasculaire maximale observée quand les tests sont réalisés avec la variété Russet Burbank (ce qui était le cas ici), ce qui pourrait expliquer pourquoi dans nos résultats, aucun des isolats n'a présenté un score maximal de 5. Cependant, ces résultats nous ont permis de voir des différences au niveau de l'agressivité des isolats de *V. dahliae* dans le territoire canadien, pour lequel il existe peu de données. Des tests supplémentaires seront nécessaires pour valider l'agressivité par groupe et de pouvoir les lier aux lignées clonales. En plus, des tests supplémentaires d'interactions avec *P. penetrans* sont conseillés pour évaluer des changements potentiels dans l'agressivité de nos isolats. Botseas et Rowe (1994) ont trouvé un synergisme entre les isolats

du VCG 4A avec le nématode *P. penetrans* pour une augmentation dans la gravité de la maladie aux États-Unis. Puisque nos résultats suggèrent une présence du VCG 4A dans la lignée 2, cela serait pertinent d'étudier les changements dans l'agressivité quand les deux organismes sont présents, surtout avec des souches trouvées dans l'ensemble du territoire Canadien et qui proviennent du même environnement.

6. CONCLUSION

Dans ce projet, nous avons réussi à isoler un grand nombre des souches de *V. dahliae* capables d'infecter la pomme de terre dans 6 provinces au Canada, et principalement des 3 provinces ayant la plus grande production de pomme de terre. Un séquençage du génome complet de toutes les souches isolées a été fait et une base de données robuste d'ADN a été obtenue qui permettra continuer avec des études supplémentaires en génomique pour continuer la caractérisation de *V. dahliae* au Canada.

Grâce aux analyse phylogénétiques, une première étude de la diversité et la variabilité génétique de *V. dahliae* au Canada a ici été accomplie, et deux lignées prédominantes ont été trouvées dans l'ensemble de provinces évaluées, avec certains sous-groupes par lignée. Deux groupes de VCG ont été associés aux séquences isolées, le VCG 4A et VCG 4B, les VCG 4A étant typiquement les plus agressifs et ceux présentant une synergie élevée avec le nématode *P. penetrans*. Il est donc nécessaire de confirmer ces groupes de comptabilité végétative avec des tests de complémentation *in vivo* et d'évaluer les différences dans l'agressivité des isolats canadiens par VCG et par sous-groupe des lignées.

Finalement, une expérience comportant des tests d'agressivité a été fait avec 7 des isolats obtenus. Deux isolats en particulier, NB19-3 et PEI19-10, ont présenté des niveaux d'AUDPC plus élevé et plus de symptômes internes (score plus élevé). Cette expérience ne peut donc pas servir comme preuve qu'il y a juste un isolat ou un ensemble d'isolats plus agressifs que d'autres dans notre groupes d'isolats, mais ça nous donne un premier aperçu des différences dans l'agressivité de certains isolats obtenus au Canada, et des variations en agressivité à l'intérieur des provinces.

BIBLIOGRAPHIE

- Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). (2022) *Russet Burbank*. https://inspection.canada.ca/DAM/DAM-plants-vegetaux/STAGING/text/texte/pota_vari_russetb_1312587653949_fra.pdf (12 mai 2022).
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC). 2004. *Potato Field Guide: Insects, Diseases and Defect : Verticillium Wilt*. Ontario. Canada.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) (2021) *Revue d'information sur les marchés de la pomme de terre*. Canada. 50 p.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) (2019) *Profil de la culture de la pomme de terre au Canada*. Ontario, Canada. 70 p.
- Agrios G. N. (2005). Plant Pathology. *Elsevier-Academic Press*. 5: 79-81.
- Alkher H. Hadrami A. Rashid K. Adam L. Daayf F. (2009) Cross-pathogenicity of *Verticillium dahliae* between potato and sunflower. *Plant pathology*. 124: 505-519.
- Ashraf A. Rauf A. Abbas M. F. Rehman R. (2012) Isolation and identification of *Verticillium dahliae* causing wilt on potato in Pakistan. *Phytopathology*. 24(2): 112-116.
- Banville G. (2008) La pomme de terre au Québec de 1908 à 2008 : un siècle de protection contre les maladies. *Phytoprotection* 89: 73-75.
- Bautista-Jalon L. S. Frenklen O. Tsrer L. Malcolm G. M. Gugino B. K. Lebiush S. Hazanovsky M. Milgroom M. G. Jimenez-Gasco M. D. M. (2020) Genetic differentiation of *Verticillium dahliae* populations recovered from symptomatic and asymptomatic hosts. *Phytopathology*. 111(1) : 149-159.
- Berlanger I. Powelson M.L. (2000) *Verticillium* wilt. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0801-01
- Bethke P. C. Nassar A. M. K. Kubow S. Leclerc Y. Li X. Q. Haroon. M. Molen T. Bamberg J. Martin M. Donnelly. D.J. (2014) History and origin of Russet Burbank (netted Gem) a sport of Burbank. *American Journal of Potato Research*. 91: 504-609.
- Borza T. Beaton B. Govindarajan A. Gao X. Liu Y. Ganga Z. Wang-Pruski G. (2018). Incidence and abundance of *Verticillium dahliae* in soil from various agricultural fields in Prince Edward Island. *European Journal of Plant Pathology*. 151: 825-830.

- Botseas D. D. Rowe R. C. (1994) Development of potato early dying in response to infection by two pathotypes of *Verticillium dahliae* and co-infection by *Pratylenchus penetrans*. *Phytopathology*. 84(3): 275-282.
- Brown C. R. (1993) Origin and history of the potato. *American Potato Journal*. 70:363-373.
- Burpee L. L. Bloom R. (1978) The influence of *Pratylenchus penetrans* on the incidence and severity of *Verticillium* wilt of potato. *Journal of nematology*. 10(1): 95–99.
- Chen J. Y. Klosterman S. J. Hu X. P. Dai X. F. Subbarao V (2021) Key insights and research prospects at the Dawn of the population genomics era for *Verticillium dahliae*. *Annual review Phytopathology*. 59: 31-51.
- Chen K. Pachter (2005) Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Comput Biol*. 1(2): 106-12.
- Chen S. Zhou Y. Chen Y. Gu J. (2018) Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 34(17): i884–i890.
- Chen D. Zebarth B. J. Goyer C. Comeau L. P. Nahar K. Dixon T. (2022) Effect of bio-fumigation on population densities of *Pratylenchus* spp. and *Verticillium* spp. and potato yield in eastern Canada. *American Journal Potato Research*. <https://doi.org/10.1007/s12230-022-09875-2>
- Chitarra G. S. Abee T. Rombouts F. M. Posthumus M. A. Dijksterhuis J. (2004) Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(5): 2823-2829
- Collado-Romero M. Mercado-Blanco J. Olivares-Garcia C. Jimenez-Diaz R. M. (2008) Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* Vegetative Compatibility Groups. *Phytopathology*. 98: 1019-1028.
- Davis J.W. (1992) Aristocrat in burlap: a history of the potato in Idaho. *American Journal of Potato Research*. 96: 139-149.
- Dennis A. Johnson K. Jeremiah K. Dung S. (2010). *Verticillium* wilt of potato – the pathogen, disease and management *Verticillium* wilt of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 32(1): 58-67.
- Derksen H. Badawi M. Henriquez M. A. Yao Z. El-Bebany A. F. Daayf F. (2012) Differential expression of potato defence genes associated with the salicylic acid defence signalling pathway in response to weakly and highly aggressive isolates of *Verticillium dahliae*. *Journal of phytopathology*. 161(3): 142-153.

- Dobinson K. Harrington M. Omer M. Rowe R. (2007). Molecular Characterization of Vegetative Compatibility Group 4A and 4B isolates of *Verticillium dahliae* associated with Potato Early Dying. Plant disease. (84). 1241 – 1245.
- Dray S. Dufour A. (2007). The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*. 22(4): 1-20.
- Drouin M. (2008) Situation de la pomme de terre au Canada et dans le monde. Colloque sur la pomme de terre CRAAQ. (Québec, 14 Novemebre 2008). 1-2.
- El-Bebany A. F. (2010) *Molecular basis of Verticillium dahliae pathogenesis on potato*. (Ph.D) (Université de Manitoba, Manitoba). 195.
- Fernald M. L. (1970) Grays manual of botany. A handbook of the flowering plants and Ferns of the central and northeastern U.S and adjacent Canada. American Book Company. 8: 1251.
- Fradin E.F. Thomma B.P.H.J. (2006) Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*. 7: 71 – 86.
- Francl L.J. (2001) The Disease Triangle: A plant pathological paradigm revisited. *The plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-T-2001-0517-01.
- Garrison E. Marth G. (2012) Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv:1207.3907v2.
- Gauhl F. Pasberg-Gauhl F. Vuylsteke D. Ortiz R. (1993). Multilocal evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain. IITA Reaserch Guide 47: 59.
- Goud J. C. Termorshuizen A. J. (2003) Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 523-534.
- Green E. D. (2001) Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Natural Reviews Genetics*. 2: 573-583.
- Grünwald N.J. Everhart S.E. Knaus B.J. Kamvar Z.N. (2017) Best practices for population genetic analyses. *Phytopathology* 107: 1000–1010.
- Gurung S. Short D. P. G. Atallah Z. K. Subbarao K. V. (2014) Clonal expansion of *Verticillium dahliae* in lettuce. *Population Biology*. 104(6): 641-649.
- Hiemstra, J. Rataj-Guranowska M. (2003). Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from the Netherland as compared to VCG diversity in Europe and in the USA. *Plant research international*. (129): 827-839.

- Iglesias-Garcia A. M. Villarroel-Zeballos. M. I. Feng C. du Toit L. J. Correll J. C. (2013) Pathogenicity, virulence, and vegetative compatibility grouping of *Verticillium* isolates from spinach seed. *Plant diseases*. 97:1457-1469.
- Inderbitzin P. Subbarao K. V. (2014) *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*. 104(6): 564-74.
- Ingram T. W. Oh Y. Adhikari T. B. Louws F. J. Dean R. A. (2020) Comparative genome analyses of 18 *Verticillium dahliae* tomato isolates reveals phylogenetic and race specific signatures. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573755>.
- Joaquim T. R. (1990) Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Genetics*. 80: 1160-1166.
- Joaquim T. R. (1991) Vegetative compatibility and virulence of strains of *Verticillium dahliae* from soil and potato plants. *Genetics*. 81: 552-558.
- Jimenez-Gasco M. D. M. Malcolm G. M. Berbegal M. Armengol J. Jimenez-Diaz R. M. (2013) Complex molecular relationship between vegetative compatibility groups (VCGs) in *Verticillium dahliae*: VCGs do not always align with clonal lineages. *Phytopathology*. 104: 650-659.
- Jones J. D. G. Dang J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329.
- Jonge R. Bolton M. D. Kombrink A. Van der Berg G. C. M. Yadeta K. A. Thomma B. (2013) Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome research*. 23: 1271-1282.
- Kabir Z. Bhat R. G. Subbarao K. V. (2004) Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant disease*. 1: 49-55.
- Klosterman S, Subbarao K, Kang S, Veronese P, Gold S, Thomma B, Chen Z, Henrissat B, Lee Y, Park J, Garcia-Pedrajas M, Barbara D, Anchieta A, de Jonge R, Santhanam P, Maruthachalam K, Atallah Z, Amyotte S, Paz Z, Inderbitzin P, Hayes R, Heiman D, Young S, Zeng Q, Engels R, Galagan J, Cuomo C, Dobinson K, Ma L. (2011) Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog*. 7(7): e1002137.
- Knaus B, Grünwald N. (2017) Vcfr: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular Ecology Resources*. 17: 44-53.
- LaMondia J. A. (2006) Management of lesion nematodes and potato early dying with rotation crops. *Journal of Nematology*. 38(4): 442-448.

- Li H, Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 25(14): 1754-1760.
- Liu S. Y. Chen J. Y. Wang J. L. Xiao H. L. Adam S. M. Dai X. F. (2013) Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. *Gene*. 529(2): 307-316.
- Madden G.J, Ewan E., Lagorio C.H. (2007) Temporal analysis I: quantifying and comparing epidemics. *J Gambl Stud*. 23: 63–83.
- Mainil J. (2005) Maladies infectieuses et micro-organismes : de la préhistoire aux postulats de Koch – grande et petite histoire. Université de Liège. 74: 169-181.
- Martin M, Riedel R, Rowe R. (1982). *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans*: Interactions in the early Dying Complex of potato in Ohio. *Phytopathology*. 72: 640 – 644.
- Manitoba Agriculture, Food and Rural Initiatives (MAFRI) (2003) Guide to Commercial Potato Production on the Canadian Prairies. Western Potato Council. 105.
- Mendiburu F, Yaseen, M. (2020) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.
- Milgroom M. G. Jimenez-Gasco M. D. M. Olivares-Garcia C. Jimenez-Diaz R. M. (2016). Clonal expansion and migration of a highly virulent, defoliating lineage of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 106(9): 1038-1046.
- Papaioannou I. A. Dimopoulou C. D. Typas M. A. (2013) Structural and phlogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 347(1): 23-32.
- Park S. T. Kim J. (2016) Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *Int Neurourol J*. 2 : 76-83.
- Powelson M. L. Rowe R. C. (1993). Biology and management of early dying of potatoes. *Annual Review Phytopathology*. 31: 111- 126.
- Puhalla J. Hummel M. (1983) Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 73: 1305- 1308.
- Rafiei V. Banihashemi Z. Bautista-Jalon L. S. Jimenez-Gasco M. D. M. Turgeon B. G. Milgroom M. G. (2018) Population genetics of *Verticillium dahliae* en iran based on microsatellite and single nucleotide polymorphism markers. *Phytopathology*. 108(6): 780-788.

- Richard C. Boivin G. (2004) *Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada*. La société Canadienne de Phytopathologie. (16). 264 – 266.
- Robertson C. (2020) *Management strategies for potato early dying complex in southern Alberta* (M.Sc.) (Université de Lethbridge, Alberta) 128 p.
- Rouselle P. Robert Y. Crosnier J. D. 1996. La pomme de terre : Production, amélioration, ennemis et maladie, utilisations. *Editions Quae*. INRA. 27-28.
- Rowe R. C. (1983) Early Dying: East and West (Disease complex, *Verticillium*, soft rot and blackleg bacteria, *Erwinia*. *American-vegetable-grower*. 31(3) 8-10.
- Rowe R. C. Powelson M. R. (2002) Potato Early Dying: Management challenges in a changing production environment. *Plant disease*. 86 (11): 1184-1193.
- Rowe R. Davis J. Powelson M. Rouse D. (1987). Potato Early Dying: Causal Agents and Management. *Plant disease*. 71(6). 482-489.
- Sheppard J. W. (1979) *Verticillium* wilt, a potentially dangerous disease of alfalfa in Canada. *Canadian Plant Diseases*. 59(3): 60.
- Smith, H. (2012). The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* (8). 450 – 478.
- Statistique Canada (STATCAN) (2021). Production canadienne de pommes de terre, octobre 2021. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/211207/dq211207f-fra.htm> (22 décembre 2021).
- Statistique Canada (STATCAN) (2005) *Les pommes de terre: production et consommation en évolution*. Ottawa, Canada. 9 p.
- Torres H. (2002). *Manual de enfermedades de la papa en el Perú*. Centro internacional de la Papa. 68 p.
- Toueni M. (2014). *Étude de l'interaction entre Verticillium alfalfae et Medicago truncatula*. (Ph.D.) (Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse) 390 p.
- Uppal, A. El Hadrami, L.R. Adam, M. Tenuta, F. Daayf, (2008) Biological control of potato *Verticillium* wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. *Biological Control*. 44(1): 90-100.
- Van der Heyden H. Dutilleul P. Duceppe M.O. Bilodeau G. J. Charron J. B. Carisse O. (2021) Genotyping by sequencing suggests overwintering of *Peronospora destructor* in southwestern Québec, Canada. *Molecular Plant Pathology*. 23(3): 339-354.

Wijesinha-Bettoni R. Mouillé B. (2019). The contribution of potatoes to global food security, nutrition and healthy diets.

Yu G. Smith D. Zhu H. Guan Y. Lam TT. (2017). ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*. 8: 28-36.

Zhou B. J. Jia P. S. Gou. H. S. (2012) Molecular characterization and functional analysis of a necrosis and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(7): 964-975.

ANNEXE

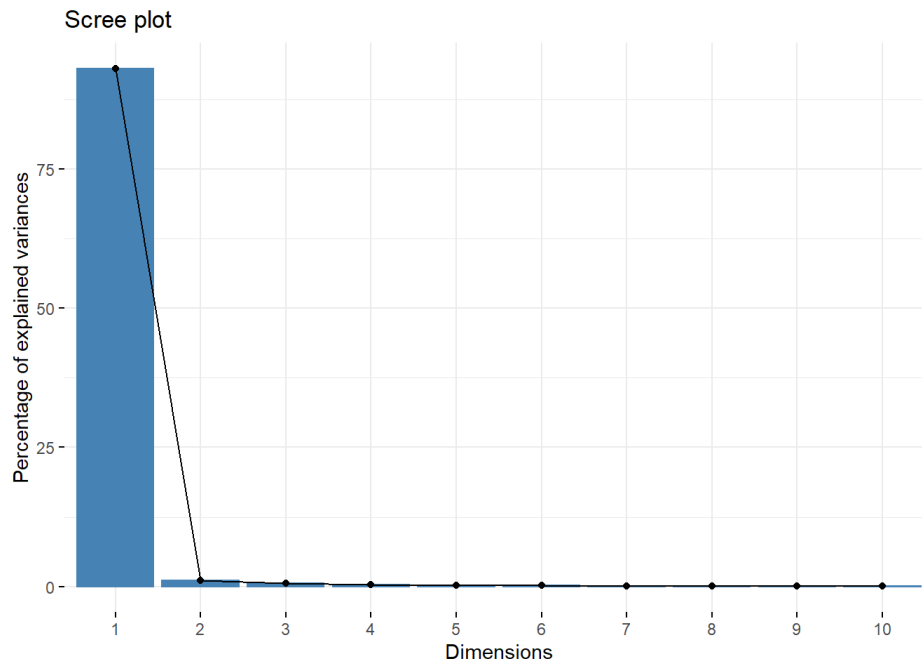


Figure S1. Scree plot de l'analyse en composantes principales pour tous les isolats de *V. dahliae* obtenus avec le pourcentage de variation plus élevé dans le première composants (Dimension 1 - Axe 1).

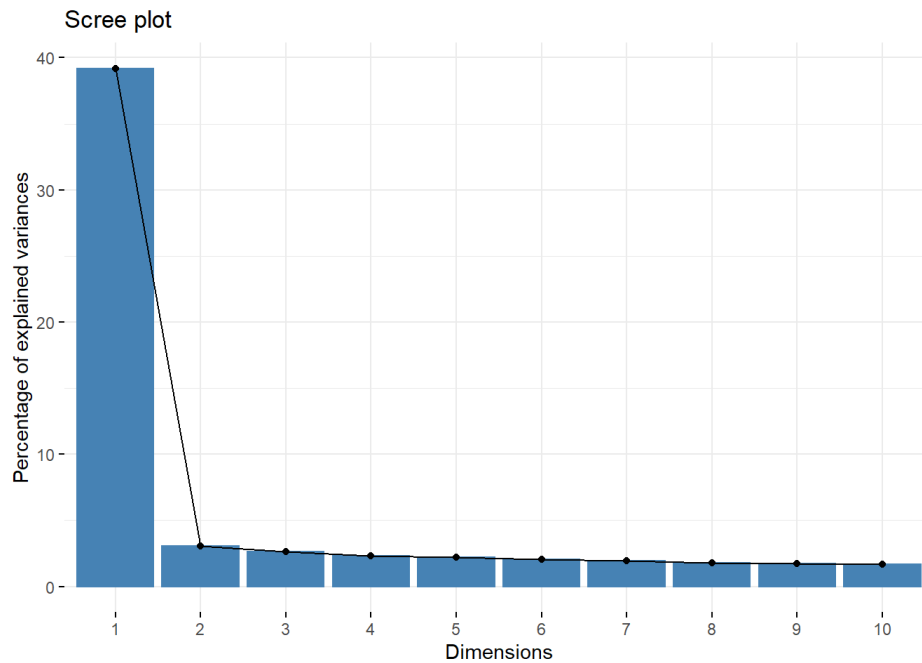


Figure S2. Scree plot de l'analyse en composantes principales pour les isolats de *V. dahliae* qui appartient à la lignée 1 avec le pourcentage de variation plus élevé dans le première composants (Dimension 1 - Axe 1).