

Projet EURO-RES :

Eurowheat: Fungicide Resistance Network

Rapport d'activité mars 2017- mars 2020

Responsable pour la Belgique :

Maxime Duvivier (CRAW) & Anne Legrève (UCL)

Collaborateurs actifs dans le projet :

Pierre Hellin (UCL & CRAW)

Aurélie Clinckemaillie (CRAW)

Charlotte Bataille (CRAW)

Tables des matières

Tables des matières	1
Résumé	1
1. Introduction	2
2. Objectifs du projet.....	4
3. Partenaires du projet	5
4. Aperçu global du projet et fonctionnement	5
5. Taches de la Belgique au sein du projet	7
5.1. Description des taches des partenaires nationaux.....	7
5.2. Essais fongicides pour la Belgique et collections d'échantillons	7
5.2.1. Saison culturale 2016-17	9
5.2.2. Saison culturale 2017-18.....	13
5.2.3. Saison culturale 2018-19.....	18
5.3. Développement d'outils moléculaires.....	24
5.4. Fréquences des mutations H152R , N86S et T79N et S524T dans les populations de <i>Z. tritici</i> collectées en champs.....	24
5.4.1. Préparation des échantillons	24
5.4.2. Cas de la Belgique.....	25
5.4.3. Carte pour l'Europe.....	26
5.4.4. Impact des traitements fongicides en saison sur l'évolution des fréquences de résistances.....	28
5.4.5. Sensibilité variétale et sélection de résistance	28
5.5. Suivi des populations par le captage de l'inoculum aérien de <i>Z. tritici</i> par des pièges à spores	29
5.5.1. Échantillonnage	29
5.5.2. Détections de mutations dans l'inoculum aérien	29
5. Tâches et livrables pour l'équipe belge	32
6. Valorisation scientifique	32
6.1. Equipe belge	32
6.2. Autres équipes du projet	34
7. Références.....	34
8. Annexes.....	36
8.1. Protocole d'installation et de gestion du réseau de capteurs	36
8.1.1. Sampling Period	36
8.1.2. Where to set up spore traps?.....	36

8.1.3.	How to set up the spore traps?	36
8.1.4.	How to make the tapes.....	37
8.1.5.	How to change the tapes.....	40
8.1.6.	How to cut the tapes and place fragment in Eppendorf	41
8.2.	Mise au point d'une méthode de quantification en temps réel de deux mutations importantes dans les résistances aux triazoles (S524T) et aux SDHI (H152R) chez la septoriose : étude de cas européens	44
8.2.1.	Abstract.....	45
8.2.2.	Graphical abstract.....	45
8.2.3.	Introduction.....	46
8.2.4.	Material and Methods.....	48
8.2.5.	Results	52
8.2.6.	Discussion	57
8.2.7.	Acknowledgements.....	59
8.2.8.	Availability of data	59
8.2.9.	Supplementary materials.....	60
8.2.10.	References.....	66
8.3.	Matériel et méthode des méthodes qPCR permettant de calculer des fréquences de mutations T79N/I et N86S	70

Résumé

À l'heure actuelle, la production de blé dans le nord de l'Europe repose sur l'application de produits phytopharmaceutiques à plusieurs reprises durant saison de croissance selon la pression phytosanitaire. En Europe, les fongicides représentent environ 25% de ces applications, la septoriose causée par *Zymoseptoria tritici* étant la principale cible. Malheureusement, le potentiel évolutif de *Z. tritici*, associé à la nature très spécifique des compositions chimiques actuelles des fongicides, expose l'agent pathogène à un risque élevé de développement de résistance aux fongicides. Au cours de la dernière décennie, les conséquences ont été constatées sur le terrain, avec des niveaux de résistance élevés signalés dans plusieurs pays européens. Outre la résistance aux fongicides, les modifications apportées dans les procédures d'enregistrement des produits phytopharmaceutiques dans l'UE ont une incidence grandissante sur la disponibilité des produits chimiques actuels et futurs. Il est donc impératif que le développement potentiel de résistance aux fongicides de la septoriose et sa propagation soient minimisés. Pour y parvenir, il est essentiel de surveiller en permanence le risque de développement et de propagation de résistances chez les populations de *Z. tritici* ainsi que d'élaborer des stratégies permettant de réduire ce risque, tout en maintenant un contrôle adéquat de la maladie. Le projet EURO-RES proposé vise à :

1. Déterminer le niveau de résistance des populations de *Z. tritici* en Europe et à analyser la dynamique de la résistance aux fongicides sur base de méthodes moléculaires,
2. Développer et tester des stratégies de contrôle IPM robustes et durables pour le contrôle de *Z. tritici* qui minimisent le risque de développement de résistance aux fongicides,
3. Rendre publiques les résultats de recherche de façon à être facilement utilisée par les services de vulgarisation et les producteurs via la plateforme EuroWheat (<http://eurowheat.au.dk>)
4. Créer un réseau de scientifiques, d'entreprises chimiques concernées, d'acteur de la vulgarisation et d'autorités compétentes qui veillera à continuer de surveiller et de diffuser des informations sur le sujet après la fin du projet.

1. Introduction

La septoriose du blé provoquée par l'agent pathogène fongique *Zymoseptoria tritici* est le pathogène du blé le plus destructeur dans les pays du nord et de l'ouest de l'Europe (O'Driscoll *et al.*, 2014). Bien que des variétés plus résistantes à cette maladie soient maintenant disponibles, le contrôle de la maladie continue de dépendre fortement de l'application de fongicides. En cas de forte pression de maladie, jusqu'à cinq applications par saison peuvent être nécessaires pour assurer le contrôle et éviter de pertes de rendement trop importantes. Compte tenu de cette dépendance aux fongicides, le développement et la propagation de résistance aux fongicides au sein des populations de *Z. tritici* en Europe pourraient avoir une incidence sur la durabilité de la production de blé. Malheureusement, l'épidémiologie et la plasticité du génome de *Z. tritici*, associées à la nature extrêmement spécifique des fongicides modernes, exposent *Z. tritici* à un risque élevé de développement de la résistance à la plupart des fongicides actuellement sur le marché (Grimmer *et al.*, 2015).

À l'exception des fongicides multi-sites, la résistance est présente dans les populations d'Europe du Nord à des fréquences variables et cela pour toutes les principales classes de fongicides utilisées contre la septoriose (Cools and Fraaije, 2013; Fraaije *et al.*, 2005; Stammler and Semar, 2011). L'impact de ces résistances sur l'efficacité des matières actives au champ dépend en grande partie du niveau et de la fréquence des résistances au sein de la population locale. Dans le cas des QoI (strobilurines), la résistance conférée par la mutation du cytochrome b (G143A) apparue chez *Z. tritici* au début des années 2000, totale et monogénique, s'est étendue extrêmement rapidement dans toute l'Europe, où les QoI ont été largement utilisés. La présence de résistance à des fréquences élevées a réduit totalement l'efficacité des QoI pour le contrôle de la septoriose (Kildea *et al.*, 2010).

Inversement, le développement de la résistance aux triazoles a été plus lent : la résistance n'est pas totale et les mécanismes impliqués sont diversifiés dans toute l'Europe (Stammler and Semar, 2011). Actuellement, les mutations du site cible, la surexpression du site cible et l'efflux de fongicides contribuent tous à la résistance aux azoles dans les populations européennes (Cools and Fraaije, 2013). Avec une diversité croissante de la résistance aux azoles aux niveaux local, régional et national, il est de plus en plus difficile de prévoir l'efficacité des triazoles dans un champ donné.

La résistance aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI), conférée par des mutations dans les gènes cibles SDH, a également été détectée dans certaines populations européennes (Dooley *et al.*, 2016). Leur fréquence reste néanmoins extrêmement basse dans les populations européennes et aucun effet indésirable sur l'efficacité des SDHI sur le terrain n'a encore été signalé.

Compte tenu des niveaux de résistance aux principaux fongicides déjà présents dans les populations européennes ainsi que de la réduction attendue du nombre de matières actives disponibles sur le marché européen (règlement 1107/2009), il est important de garantir une approche commune en matière de gestion de la résistance aux fongicides dans les cultures de blé européennes.

Alors que diverses organisations nationales (instituts de recherche et universités) et les principaux fabricants de fongicides mettent en œuvre des programmes de surveillance et de recherche, ceux-ci n'ont généralement qu'une portée nationale. Les différences de méthodologie, depuis la collecte des échantillons jusqu'à l'analyse de la sensibilité des populations, et l'analyse des données peuvent entraîner des différences dans les estimations de sensibilité, ainsi que dans les recommandations des agriculteurs qui en découlent. Le projet EURO-RES n'est pas conçu pour remplacer ces programmes nationaux étendus, mais il évaluera de manière centralisée la sensibilité des populations de *Z. tritici* à plusieurs

fongicides pour les cinq pays partenaires au cours des trois années du projet. Le projet fournira un aperçu indépendant de la sensibilité des fongicides existants entre les différents pays. En examinant les mécanismes moléculaires de la résistance au sein de ces populations (ex : mutations du site cible, par exemple, figure 1), EURO-RES sera en mesure de se connecter aux programmes nationaux de surveillance et de recherche en cours, dans lesquels un dépistage moléculaire similaire est effectué. EURO-RES se chargera aussi d'évaluer le potentiel de l'utilisation de pièges à spores comme moyen de déterminer les fréquences de résistance.

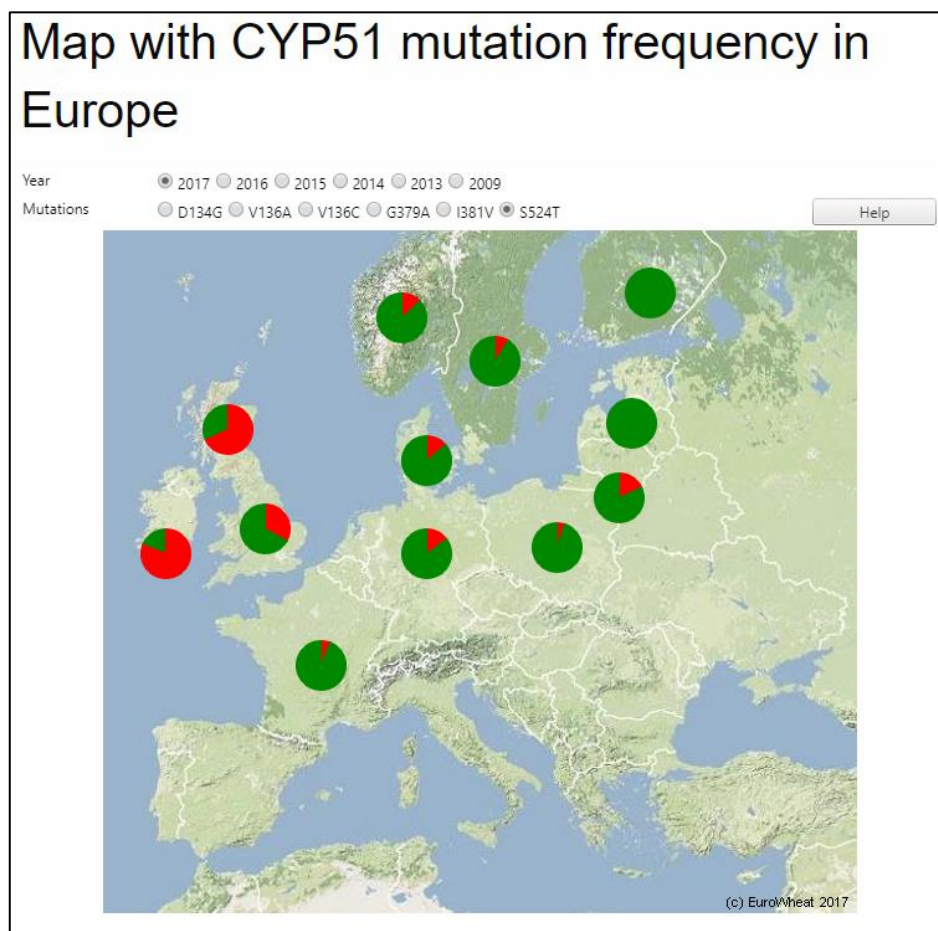


Figure 1. Cartographie de la distribution de certains allèles de résistance (ici S524T) aux triazoles portées par le gène CYP51 de *Z. tritici*. Ces résultats d'évolution temporelle et spatiale de la résistance sont disponibles sur le portail web d'EUROWheat.

La disponibilité et la dépendance vis-à-vis des fongicides pour lutter contre la septoriose étant différentes dans toute l'Europe, il est extrêmement important de comprendre comment la résistance se développe et se propage à l'échelle d'un pays ou de l'Europe afin que les mesures anti-résistance soient efficaces. Dans le cas de la résistance aux triazoles, Bunner *et al.* (2008) ont suggéré que les premiers allèles résistants avaient une faible fréquence d'apparition et se déplaçaient vers l'est, tandis que dans le cas des QoI, Torriani and Brunner (2009) ont suggéré que la résistance (G143A) était apparue presque simultanément à au moins quatre reprises dans la population européenne à des endroits différents.

Dans le cas des QoIs, la résistance était complète et les fongicides composés de ces molécules ne sont désormais plus recommandés pour le contrôle de la septoriose en Europe du Nord. Bien que les triazoles conservent une efficacité dans de nombreuses régions, l'accumulation de différents mécanismes de résistance au sein des populations locales a commencé à réduire leurs efficacités.

Les différences de sensibilité aux fongicides des populations de *Z. tritici* dans les pays partenaires du projet EURO-RES offrent une occasion unique d'identifier la dynamique de la sélection de la résistance à l'échelle locale, régionale et internationale. De plus, la diversité des populations de septoriose présentes au sein des pays membres d'EURO-RES permet d'évaluer la robustesse des mesures d'anti-résistance dans les populations de *Z. tritici* en phases d'émergence, de sélection et d'adaptation de la résistance aux fongicides.

2. Objectifs du projet

L'objectif général du projet est surveiller le risque développement et propagation de résistances aux triazoles et SDHI dans les populations de *Z. tritici* ainsi que d'élaborer des stratégies permettant de réduire ce risque, tout en maintenant un contrôle adéquat de la maladie.

Pour parvenir à cet objectif général, plusieurs objectifs spécifiques ont été établis :

1. Utiliser la diversité de sensibilité aux fongicides présente dans les différentes populations de *Z. tritici* comme moyen d'optimiser les méthodes de détection
2. Utiliser la diversité de pression de maladie et des populations de *Z. tritici* présentes dans les pays partenaires pour évaluer l'efficacité des stratégies anti-résistance des fongicides
3. Mieux comprendre le développement et la propagation de la résistance aux fongicides chez les populations de *Z. tritici* à l'échelle de l'Europe du Nord.
4. Accroître la collaboration entre les chercheurs de toute l'Europe centrés sur la résistance aux fongicides chez les agents pathogènes des céréales et fournir un cadre pour de futures collaborations

3. Partenaires du projet

Tableau 1. Informations et contacts des différents partenaires du projet EURO-RES

Partenaire et acronyme	Nom et institut	Adresse	Contact
P1 TEAGASC	Dr Steven Kildea Teagasc	Oak Park Carlow Ireland	stephen.kildea@teagasc.ie Tel.: 00353 599170288 Mobile: 00353 876606528
P2 AU	Mrs Lise Nistrup Jørgensen Aarhus University	Forsøgsvej 1 4200 Slagelse Denmark	lisen.jorgensen@agro.au.dk Tel.: 0045 8715 8234 Mobile: 0045 22283352
P3 CRAW	Dr Maxime Duvivier Walloon Agricultural Research Centre	Rue du Bordia 11 5030 Gembloux Belgium	m.duvivier@cra.wallonie.be Tel.: 0032 81 62 52 68 Mobile: 0032 487 376 976
P4 SLU	Dr Björn Andersson Swedish University of Agricultural Sciences	Almas allé 5, Box 7026 SE-75007 Uppsala Sweden	Bjorn.LE.Andersson@slu.se Tel.: 0046 18671617 Mobile: 0046 705402680
P5 UCL	Prof Anne Legrève Université Catholique de Louvain	Croix du Sud, 2, box L7.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve Belgium	anne.legreve@uclouvain.be Tel.: 0032 010 47 34 09 Mobile: 0032 0494 27 38 86
P6 JKI	Dr Bernd Rodemann Julius Kühn-Institut	Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig Germany	bernd.rodemann@julius-kuehn.de Tel.: 0049 5312994550

4. Aperçu global du projet et fonctionnement

Les activités de recherche du projet EURO-RES se répartissent en quatre « workpackages » (WP) (figure 2) :

WP1: Etablissement des protocoles

WP2: Mesure de la sensibilité des populations aux fongicides

WP3: Diminuer la propagation des résistances

WP4: Comprendre l'évolution des résistances à travers l'Europe

Les protocoles élaborés dans le WP1 sont utilisés dans les WP2, WP3 et WP4.

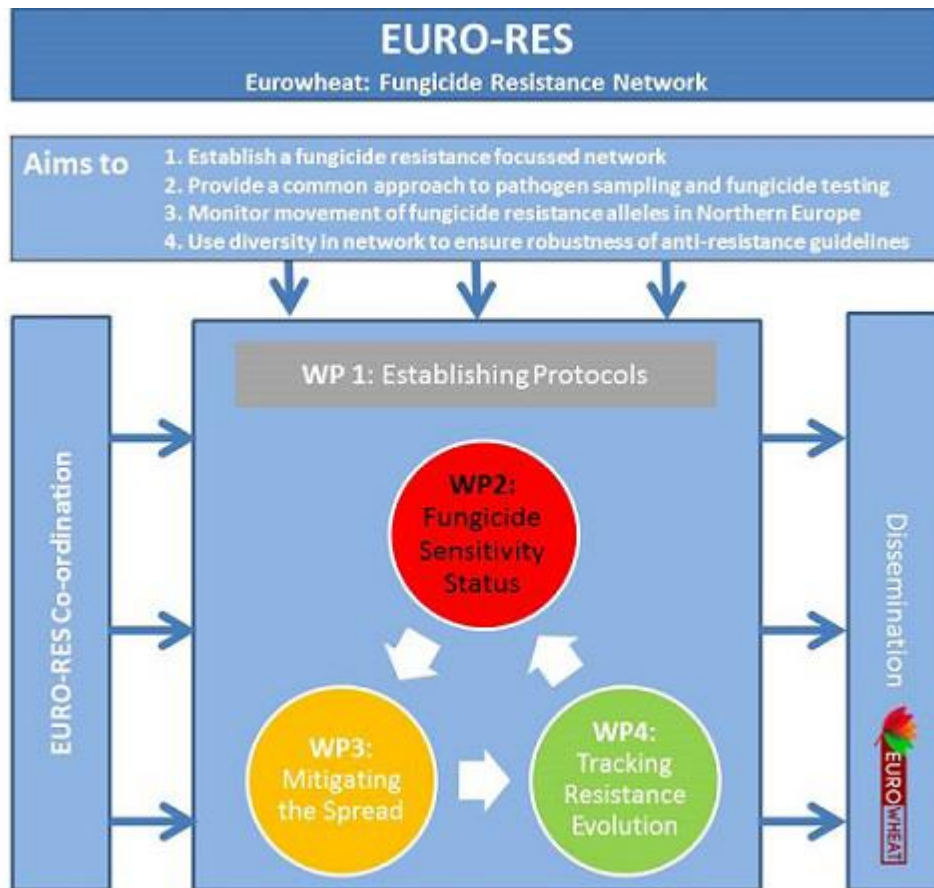


Figure 2. Aperçu général de l'organisation du travail au sein d'EURO-RES

En résumé :

Au cours des trois premiers mois du projet, des protocoles détaillant les procédures pour l'échantillonnage, l'obtention de souches de *Z. tritici*, l'analyse de leur sensibilité ainsi que les essais mis en place sur le terrain ont été élaborés et approuvés par tous les membres.

En 2017 et 2018, deux capteurs Burkard par pays ont été mis en place entre le 1 septembre et 30 novembre dans 2 champs de blé espacés d'au moins 100 km. Les fréquences de mutations de certains gènes conférant des résistances ont été évaluées dans les collections d'ADN de l'inoculum aérien collecté avec ces capteurs.

Durant les 3 ans du projet, des feuilles présentant des symptômes ont été prélevées dans les champs où les capteurs ont préalablement échantillonné l'air. Ces prélèvements ont été effectués à la sortie de l'hiver. Vingt souches par champ ont ensuite été isolées à partir de ces échantillons et la sensibilité de ces souches aux fluxapyroxad, tébuconazole et prothiconazole a été mesurée.

Dans un des 2 champs, un essai fongicide a, chaque année, été mis en place avec un protocole commun pour les différents pays membre du projet. Dans chacune des modalités, des feuilles ont été récoltées 4 semaines après les derniers traitements afin de procéder à des mesures de sensibilité des populations à l'aide de différents outils.

En mars-avril 2019, des échantillons de feuilles ont été prélevés dans des champs d'agriculteurs (5 à 10 champs par pays) avant que des traitements fongicides ne soient effectués. Des feuilles ont aussi été prélevées après l'application des traitements fongicides. Ces échantillons ont été analysés afin de déterminer la fréquence de certaines mutations conférant la résistance aux SDHI et aux DMI.

La mesure de la sensibilité des isolats issus de l'échantillonnage de feuilles dans les champs et dans les essais a été effectuée par 3 partenaires (P1 TEAGASC, P2 AU et P6 JKU). La quantification des fréquences de mutations conférant de la résistance (CYP51 et SDHc) dans l'inoculum aérien ainsi que dans les feuilles a été réalisée par le CRA-W (P3) et l'UCL (P5). Chacun des partenaires a supervisé la gestion d'essais fongicides, des capteurs de spores et la collecte des échantillons dans son pays.

Les isolats de *Z. tritici* obtenus et les collections nationales disponibles auprès des différents partenaires ont été fournis à SLU (P4) pour une analyse moléculaire plus poussée du développement et de la propagation de la résistance à travers l'Europe du Nord.

Une analyse globale des données est toujours en train d'être réalisée par l'ensemble des partenaires. Toutes les conclusions générées seront publiées sous forme d'articles scientifiques et rendues publiques sur la plateforme Eurowheat.

Ce rapport relate uniquement les résultats obtenus principalement par l'équipe belge et ne constitue pas le rapport final du projet dans sa globalité.

5. Taches de la Belgique au sein du projet

5.1. Description des taches des partenaires nationaux

Le CRAW était responsable de toutes les opérations sur le terrain pour la Belgique. Ceci comprenait la mise en place et la gestion de l'essai fongicide annuel, le piégeage des spores et les opérations d'échantillonnage. Le CRAW était de plus le responsable de la collecte de spores pour l'ensemble du réseau de capteurs du projet (10 capteurs dans 5 pays). Il a aussi réalisé les opérations d'extraction de l'ADN de l'inoculum aérien obtenus avec les capteurs afin de permettre la quantification de l'ADN *Z. tritici* et la détection des mutations conférant des résistances. Le CRAW a aussi contribué à développer les outils moléculaires permettant la détection des résistances dans divers échantillons. Il a procédé à une partie de l'analyse des échantillons.

L'UCL a contribué à ce projet en quantifiant l'inoculum aérien de *Z. tritici* à partir d'échantillons provenant du réseau de capteurs et des champs. L'UCL a aussi développé les outils moléculaires innovants permettant la détection des résistances.

5.2. Essais fongicides pour la Belgique et collections d'échantillons

Au total 3 essais fongicides ont été menées par le CRAW (saisons 2016-17, 2017-18, 2018-19). Les 3 essais ont toujours été implantés à Thy-le-Château.

Le protocole des programmes fongicides appliqués les 2 premières années est décrit dans le tableau ci-dessous (tableau 2). Dans l'essai, des programmes fongicides à base de prothioconazole (DMI), seuls ou en mélange avec d'autres familles fongicides (fongicide SDHI et fongicide multisite), sont appliqués de façon curative (ZGS55) ou préventive (ZGS39). Le protocole comprend aussi des programmes fongicides dits « nationaux » qui diffèrent pour chaque pays membre du projet. Ces derniers programmes reflètent les pratiques courantes du pays pour la protection du blé. L'objectif de ces essais est d'identifier à terme quelles pratiques sélectionnent particulièrement la résistance aux fongicides. Pour la saison 2016-2017, la variété Henrik sensible à la septoriose a été utilisée. Pour la saison 2017-18, l'essai a été mené sur Henrik et sur Mentor, une variété moyennement sensible à la septoriose.

Tableau 2. Protocole de l'essai belge du projet EURORES mené pour la saison 2016-17 et 2017-18 à Thy-le-Château.

Modalité	Type	Programme	Famille fongicide
1	Témoin	Témoin	
2	Préventif	Proline 0.8l (39)	DMI
3	Préventif	Velogy Era 1l (39)	DMI+SDHI
4	Préventif	Velogy Era 1l + Bravo 1l (39)	DMI+SDHI+MULTI
5	Curatif	Proline 0.8l (55)	DMI
6	Curatif	Velogy Era 1l (55)	DMI+SDHI
7	Curatif	Velogy Era 1l + Bravo 1l (55)	DMI+SDHI+MULTI
8	National	Kestrel 1.25l + Bravo 1l (32) // Librax 1.5l (55)	DMI+SDHI+MULTI
9	National	Librax 1.5l + Bravo 1l (39) // Prosaro 1l (65)	DMI+SDHI+MULTI
10	National	Librax 0.8l + Bravo 1l (32) // Aviator Xpro 1.25l (55)	DMI+SDHI+MULTI

Pour la saison 2018-2019, il a été choisi de comparer l'effet de différents produits appliqués au stade 39 sur le contrôle de la septoriose et la sélection de résistance. Le protocole a été modifié en ajoutant certaines nouvelles spécialités telles que le fenpicoxamid (GF-3307) et le mefentrifluconazol (BAS 750 01F) ainsi que le benzovindiflupyr appliqué seul (Elatus Plus). Les programmes fongicides dits « nationaux » ont été conservés (Tableau 3).

Avant les premiers traitements de chaque saison, des prélèvements (50 feuilles) ont été effectuées dans le champ de l'essai ainsi que dans l'autre champ où un capteur avait été installé. Quatre semaines après les derniers traitements, 20 feuilles ont été collectées dans chaque parcelle et ont été envoyées au TEAGASC en Irlande.

Concernant les données des essais relatifs aux maladies et rendements, leur intérêt réside dans la comparaison entre pays et années et dans la mise en relation avec des données concernant la sélection de résistance par les programmes fongicides. Ces résultats seront disponibles dans le rapport global du projet EURORES.

Tableau 3. Protocole de l'essai belge du projet EURORES mené pour la saison 2016-17 et 2017-18 à Thy-le-Château.

Modalité	Type	Programme	Famille fongicide
1	Témoin	Témoin	
2	Produit	Proline 0.8 l (39)	DMI
3	Produit	Velogy Era 1 l (39)	DMI+SDHI
4	Produit	Velogy Era 1 l + Bravo 1 l (39)	DMI+SDHI+MULTI
5	Produit	Elatus Plus 0.75 l (39)	SDHI
6	Produit	BAS 750 01F 1.5 l + Imtrex 1.2 l (39)	DMI+SDHI
7	Produit	GF-3307 1.5 l (39)	DMI+ QiI
8	Produit	Ascra Xpro 1.5 l (39)	DMI+2 SDHI
9	National	Kestrel 1.25 l + Pugil 1 l (32) // Librax 1.5 l (55)	DMI+SDHI+MULTI
10	National	Librax 0.8 l + Pugil 1 l (32) // Aviator Xpro 1.25 l (55)	DMI+SDHI+MULTI

Nous présentons ci-dessous les résultats obtenus de l'essai mis en place en Belgique pour les 3 saisons culturales. Les données brutes disponibles pour ces essais sont classées dans 3 fichiers Excel (2017-EURORES-trial-field-Belgium-results.xlsx; 2018-EURORES-trial-field-Belgium-results.xlsx; 2019-EURORES-trial-field-Belgium-results.xlsx)

5.2.1. Saison culturale 2016-17

Les tableaux 4 et 5 renseignent les informations phytotechniques importantes de l'essai mené lors de la saison 2016-17.

Tableau 4. Informations phytotechniques de l'essai belge EURORES 2016-2017

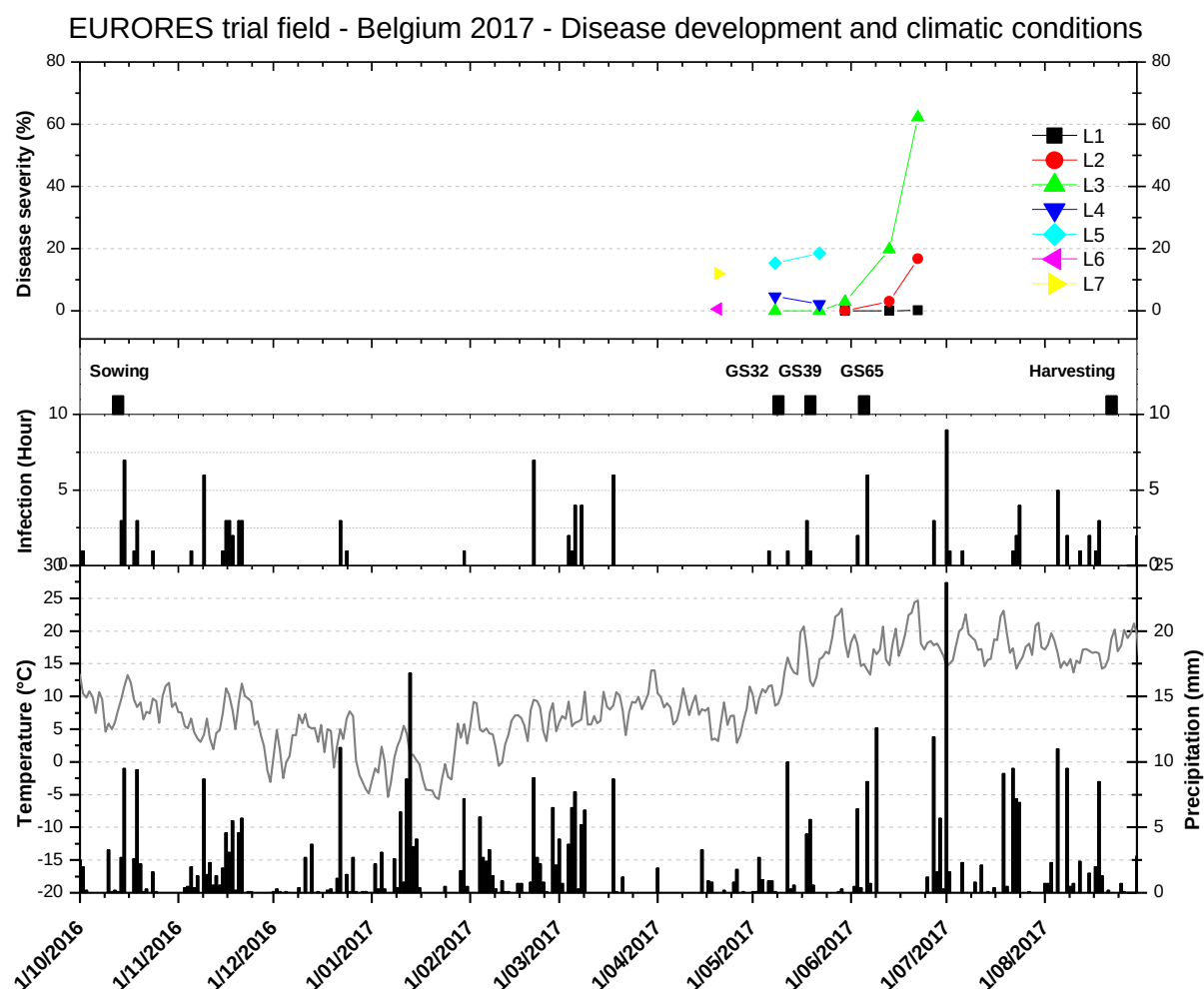
Lieu	Thy-le-Château
Variété	Henrik
Date de semis	13/10/2016
Densité (grain/m2)	250
Précédent	Pomme de terre
Date de récolte	22/08/2017
Coordonnées gps	50.28077//4.43265

Tableau 5. Date de traitement et stade observé pour l'essai belge EURORES 2016-2017

Traitement	ZGS voulu	Date	ZGS observé
1	32	9/05/2017	32
2	39	22/05/2017	43
3	55	30/05/2017	61
4	65	10/06/2017	69

En 2017, des conditions favorables d'infection de la septoriose ont été observées de façon régulière entre le stade 32 et le stade 65 dans l'essai (figure 3). Ceci a permis à la septoriose de s'installer sur le feuillage supérieure mais la pression est restée assez faible. En effet, après la floraison, il n'a pas plu pendant une période de 3 semaines.

Le 22 juin 2017, la septoriose était surtout visible sur les étages foliaires 2 et 3 et tout juste visible sur la dernière feuille (<1%). Les traitements uniques au stade 39 et stade 55 n'ont pas réduit efficacement les symptômes de septoriose sur l'étage 2 et 3 (figure 4). Les traitements dits nationaux ont permis un meilleur contrôle. Les températures importantes enregistrées en juin ont permis le développement de la rouille brune. Celle-ci est apparue à la fin mai et s'est développée de façon importante jusqu'à début juillet. En considérant la figure 5 qui montre les surfaces vertes observées dans l'essai le 3 juillet sur les deux derniers étages foliaires, les programmes fongicides permettent une protection similaire des deux dernières feuilles. Les traitements à base de prothioconazole seule (curatif et préventif) sont toutefois moins efficaces. Logiquement, les programmes nationaux comprenant plusieurs traitements fongicides sont plus performants.



Mis à part celui du témoin, les rendements obtenus avec les divers programmes fongicides ne sont pas différents statistiquement (figure 6). Ceci est due à une variabilité dans les répétitions provoquée par la sécheresse du mois de juin. De plus la sécheresse a littéralement stoppé le potentiel des programmes fongicides : le feuillage a séché avant que les protections fongicides ne craquent sous l'effet des maladies. Un phénomène de lissage des rendements est donc observé.

EURORES trial field - Belgium 2017 - STB symptoms - 22/06/2017

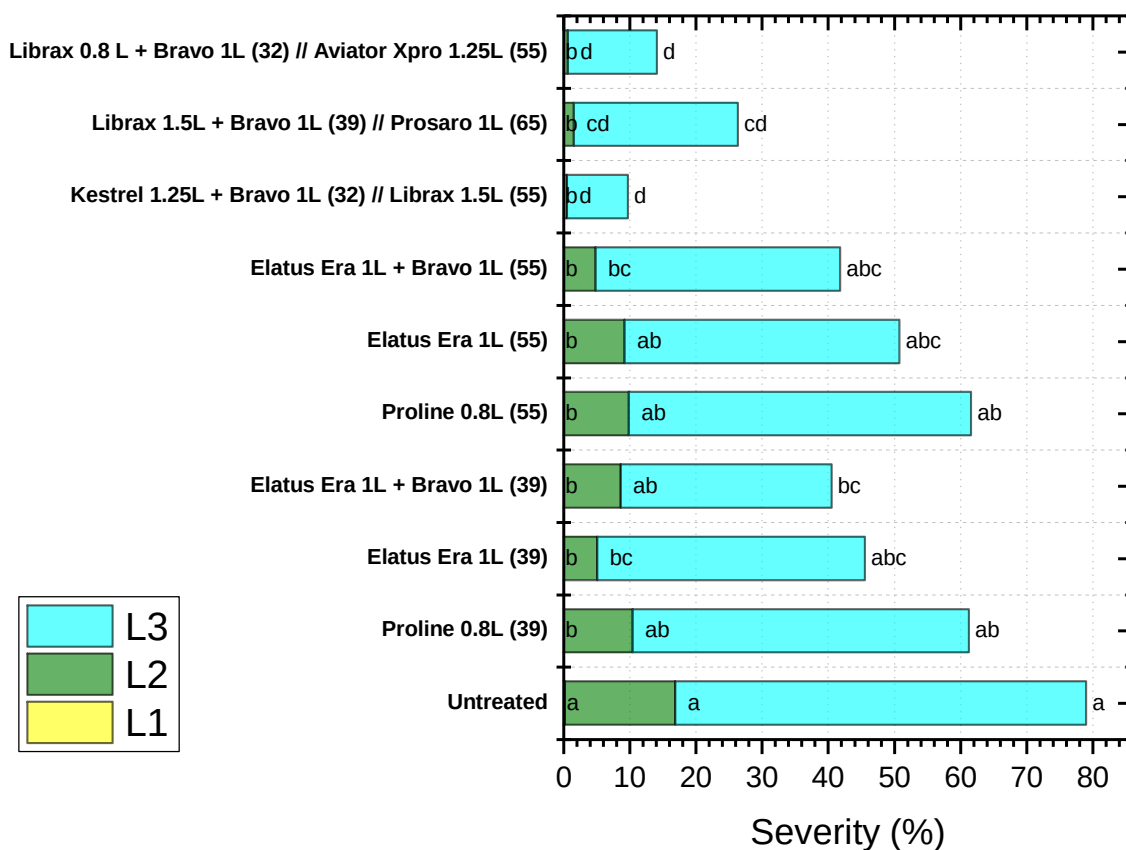


Figure 4. Sévérité de la septoriose sur les 3 derniers étages foliaires observée le 22 juin 2017 dans l'essai belge EURORES 2016-2017 à Thy-le-Château.

EURORES trial field - Belgium 2017 - Green Leaf Area - 3/07/2017

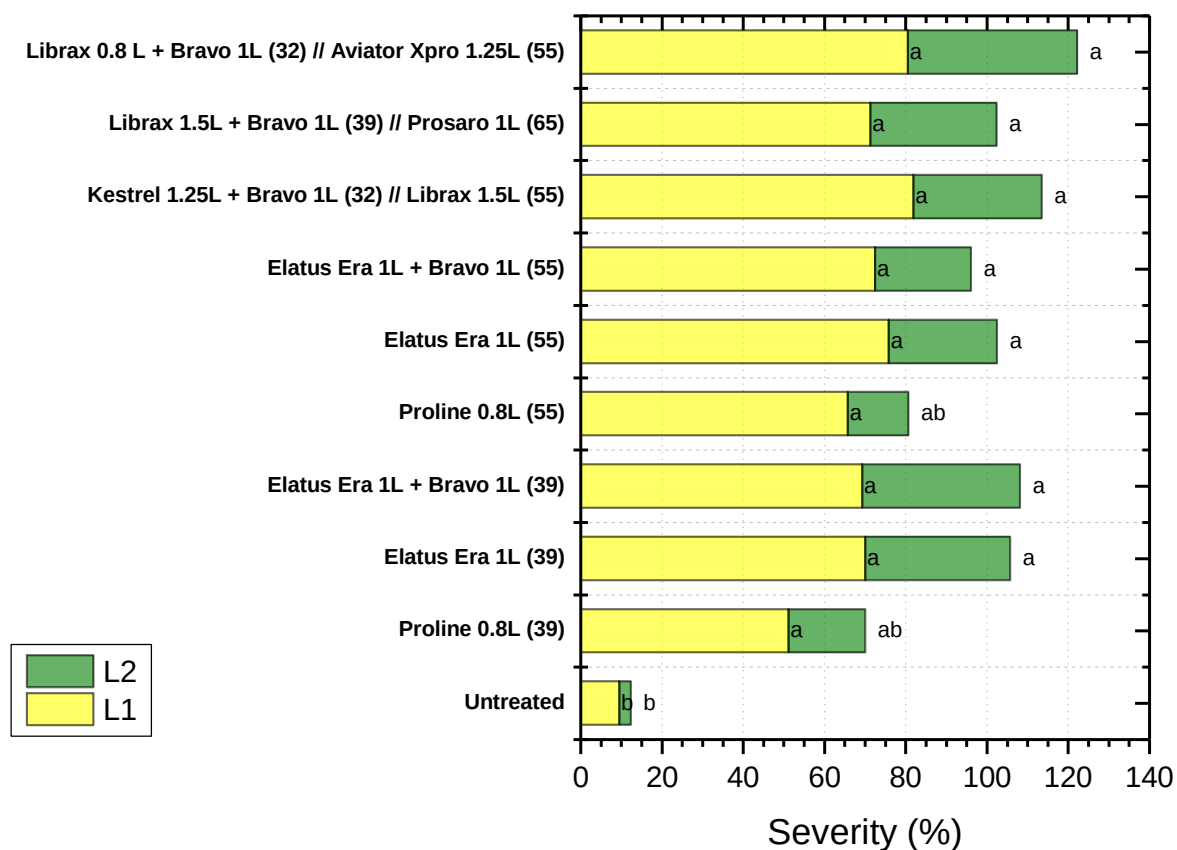


Figure 5. Surface verte observée sur les 2 derniers étages foliaires le 3 juillet 2017 dans l'essai belge EURORES 2016-2017 à Thy-le-Château.

EURORES trial field - Belgium 2017 - Yield (15% humidity)

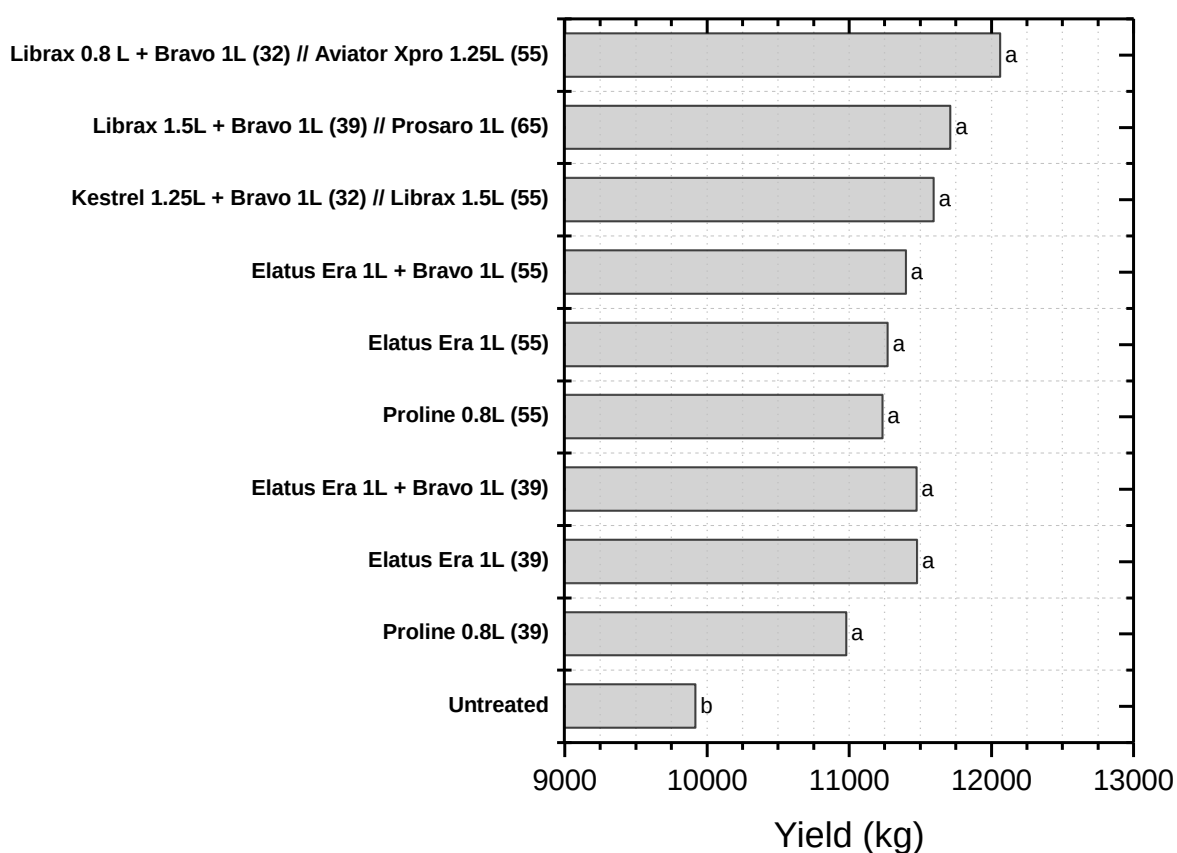


Figure 6. Rendements bruts mesurés dans l'essai belge EURORES 2016-2017 à Thy-le-Château.

5.2.2. Saison culturale 2017-18

Les tableaux 6 et 7 renseignent les informations phytotechniques importantes de l'essai mené lors de la saison 2017-18.

Tableau 6. Informations phytotechniques de l'essai belge EURORES 2017-2018

Lieu	Thy-le-Château
Variété	Henrik/Mentor
Date de semis	16/10/2017
Densité (grain/m ²)	270 g/m ²
Précédent	Pomme de terre
Date de récolte	20/07/2018
Coordonnées gps	50.280038//4.432199

Tableau 7. Date de traitement et stade observé pour l'essai belge EURORES 2017-2018

Traitement	ZGS voulu	Date	ZGS observé
1	32	3/05/2018	32-
2	39	22/05/2018	43
3	55	31/05/2018	59
4	65	5/06/2018	65

En 2018, aucun pic d'infection n'a été mesuré entre le stade 32 et le stade 39 (figure 7). La septoriose a donc tardivement atteint les 3 derniers étages foliaires. Seuls quelques pics ont été mesurés ensuite entre le stade 39 et la maturation ce qui a finalement permis à la maladie d'atteindre les dernières feuilles. A nouveau, les conditions climatiques observées à partir de mi-juin (après la floraison) étaient très défavorables au développement de la septoriose. Il n'a pas plu pendant 30 jours. La septoriose est donc restée très discrète sur les étages foliaires supérieurs des plantes. Les températures importantes enregistrées en juin et en juillet ont à nouveau permis un développement important de la rouille brune. Elle est apparue à la fin mai sur les 2 variétés et s'est développée de façon très importante jusqu'à début juillet couvrant une surface importante des dernières feuilles dans les parcelles non traitées (témoins). Dans les 2 essais, de l'helminthosporiose du blé était aussi visible.

La figure 8 indique que les traitements curatifs (stade 55) ont été effectués trop tard pour protéger efficacement les dernières feuilles. De même, les traitements préventif (stade 39) à base d'une triazole seule ne sont pas suffisants et cela malgré une faible pression de septoriose. La figure 9 indique que, seuls, tous les programmes offraient une protection du feuillage conséquente sauf le témoin et les programmes à base de triazole seules. Ces derniers programmes n'ont pas permis d'endiguer la faible pression de septoriose et surtout l'important développement de rouille brune. Les rendements mesurés dans l'essai reflètent parfaitement cette dernière observation. A part dans les parcelles témoins, les rendements obtenus avec les divers programmes fongicides ne sont pas différents statistiquement (figure 10). Bien que les rendements soient conséquents, ils auraient sans doute pu être encore meilleurs. La sécheresse et les fortes chaleurs ont à nouveau freiné le potentiel des programmes fongicides : le feuillage a séché avant que les protections fongicides ne s'effondrent sous l'effet des maladies. A l'instar de la saison précédente, un phénomène de lissage des rendements est donc à nouveau fortement observé.

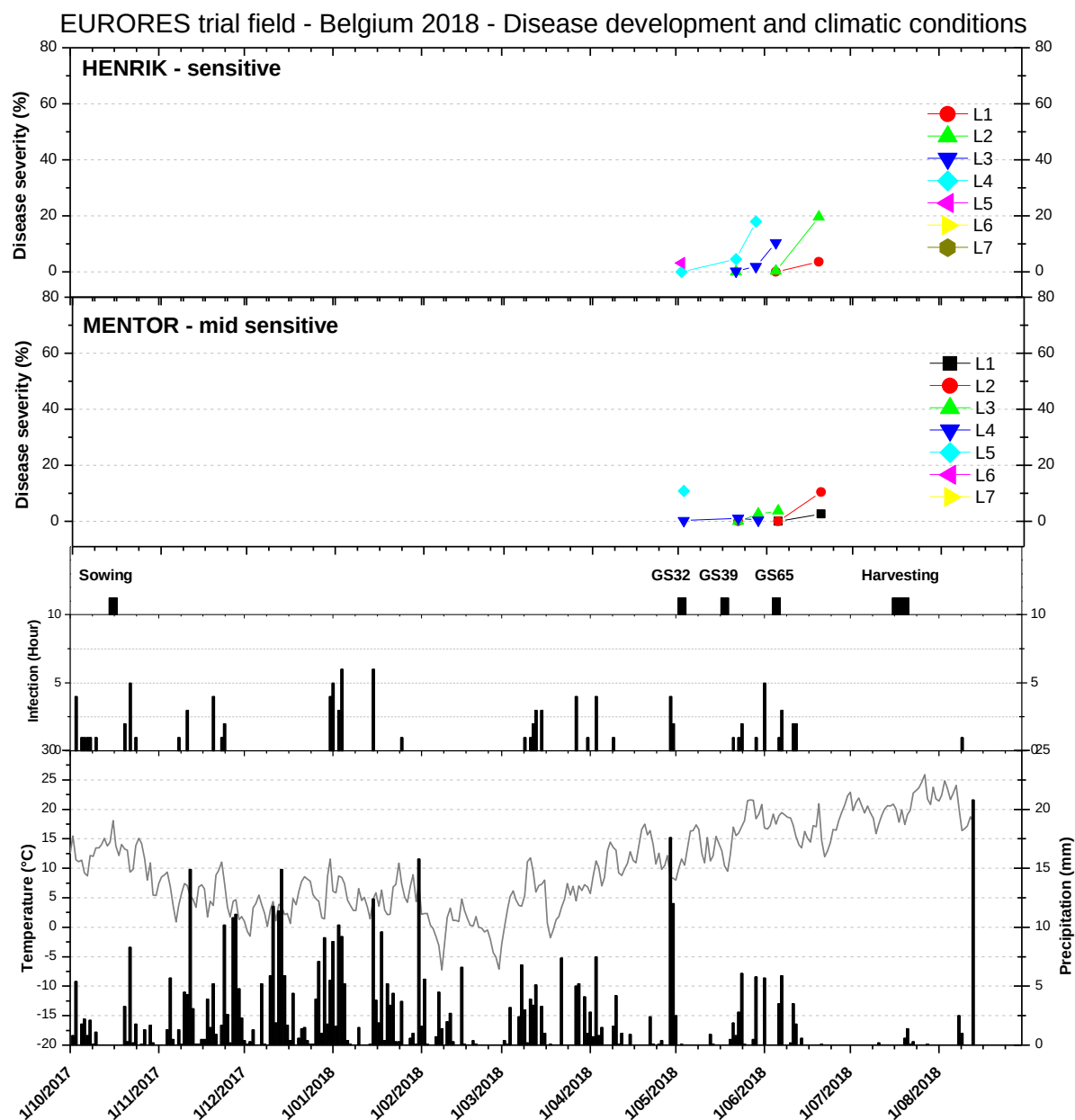


Figure 7. a) Sévérité de la septoriose sur les différents étages foliaire de la variété sensible Henrik et la variété mi-sensible Mentor. b) Développement phénologique du blé c) Nombre d'heures par jour propices à l'infection de la septoriose (proculture modifié par M. Duvivier) d) Température et précipitations mesurées à proximité de l'essai. Essai belge EURORES 2017-2018.

EURORES trial field - Belgium 2018 - STB symptoms - 20/06/2018

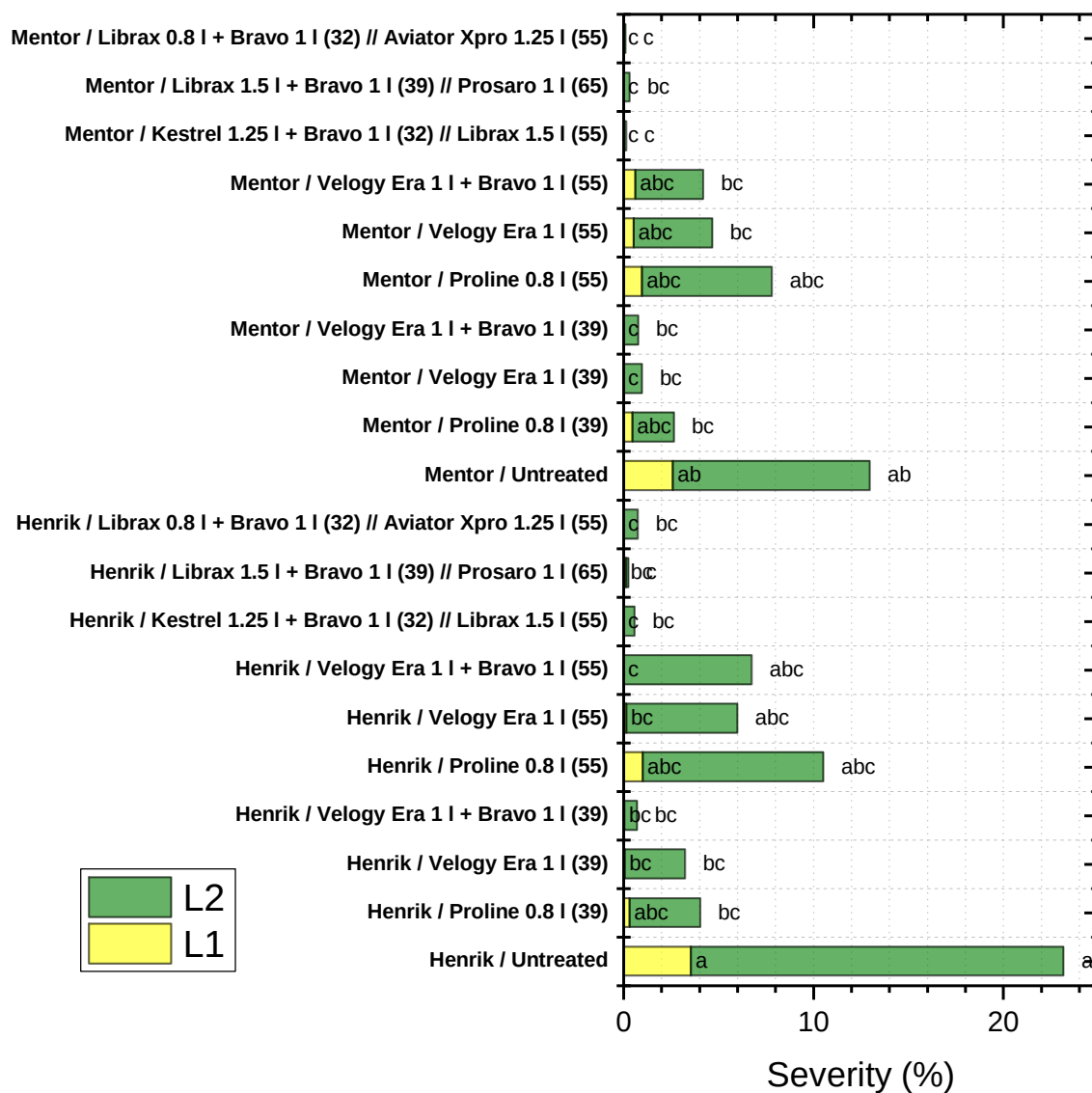


Figure 8. Sévérité de la septoriose sur les 2 derniers étages foliaires observée le 20 juin 2018 dans l'essai belge EURORES 2017-2018 à Thy-le-Château.

EURORES trial field - Belgium 2018 - Green leaf area - 02/07/2018

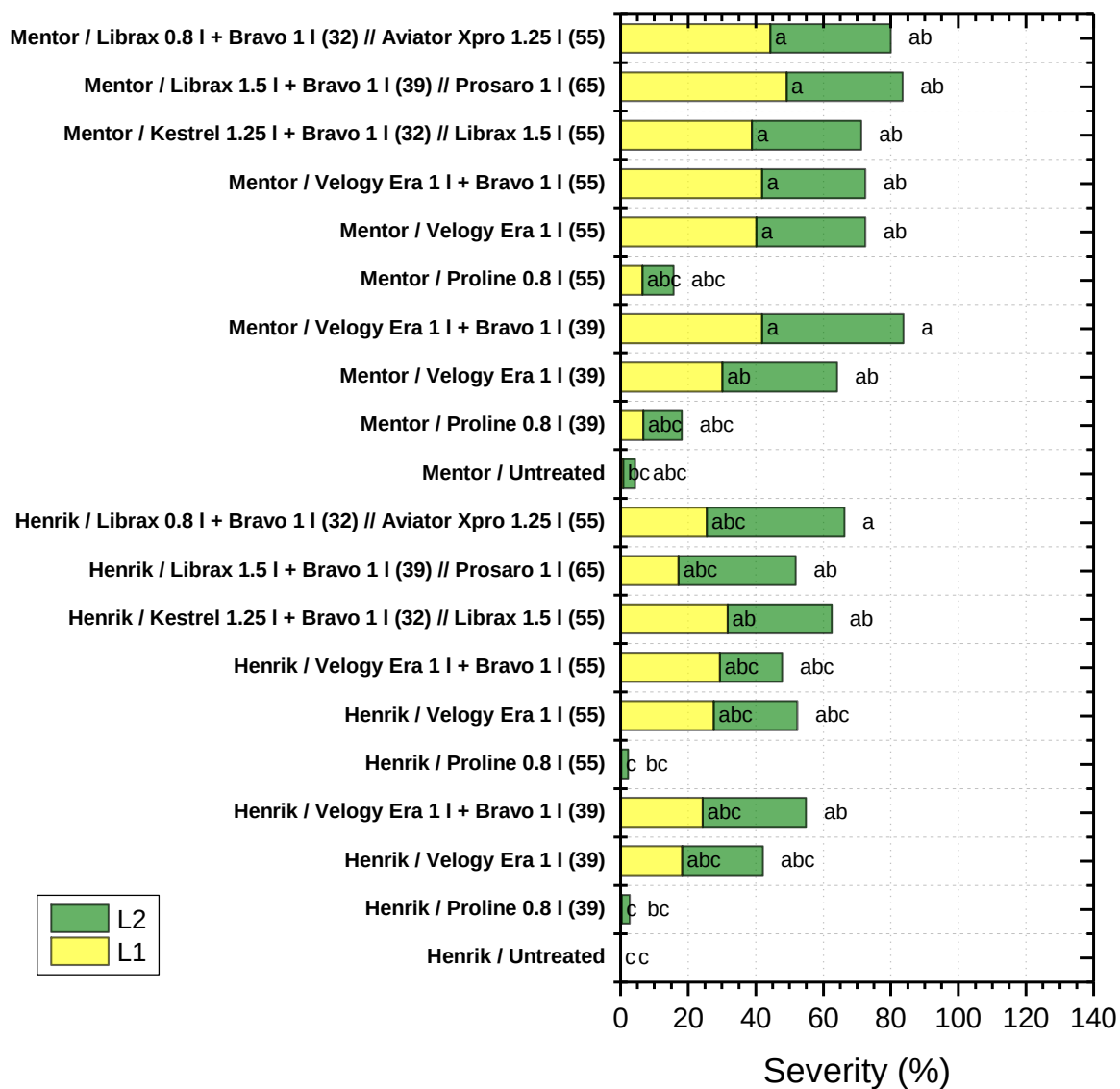


Figure 9. Surface verte observée sur les 2 derniers étages foliaires le 3 juillet 2018 dans l'essai belge EURORES 2017-2018 à Thy-le-Château.

EURORES trial field - Belgium 2018 - Yield (15% humidity)

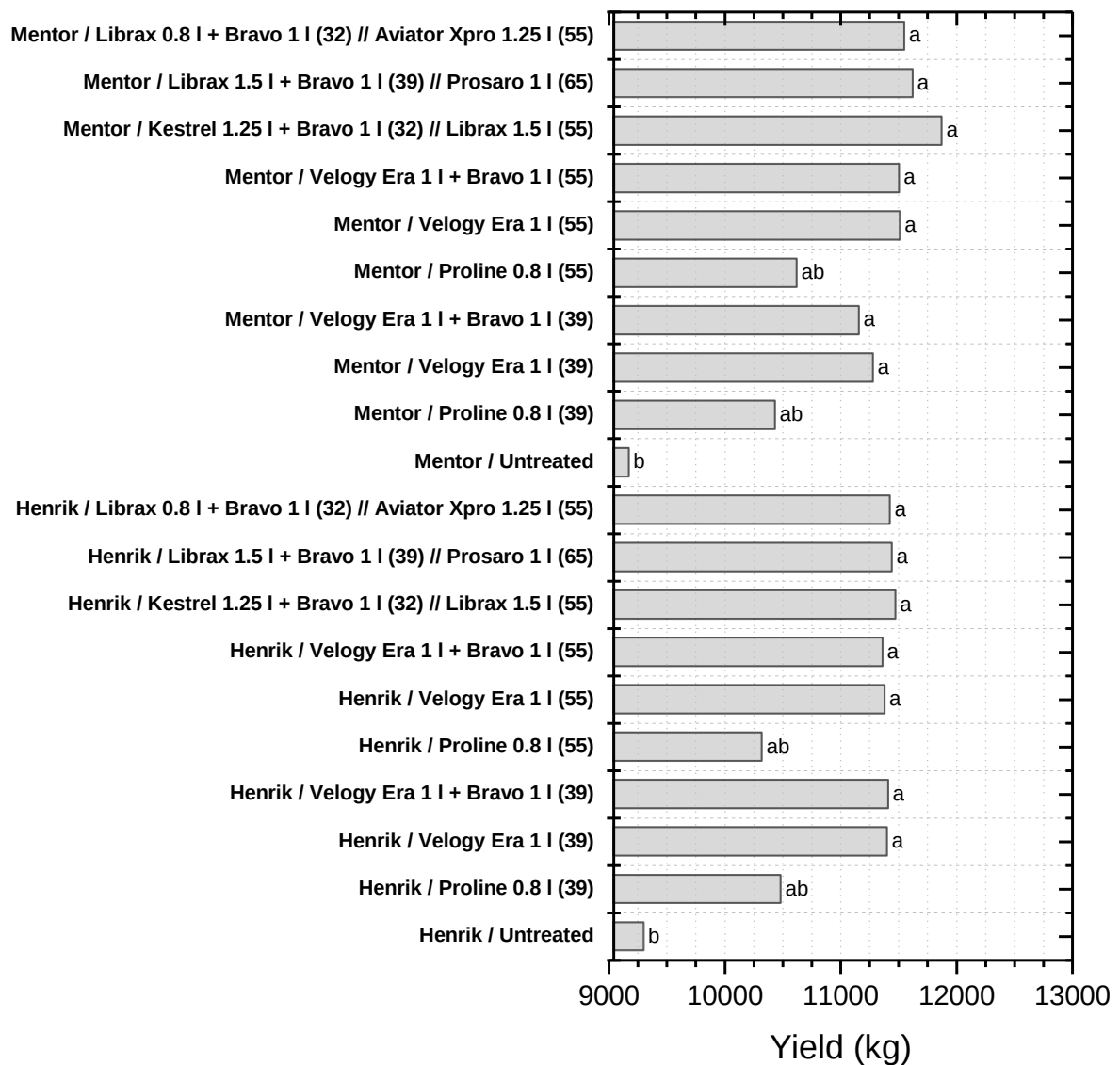


Figure 10. Rendements bruts mesurés dans l'essai belge EURORES 2017-2018 à Thy-le-Château.

5.2.3. Saison culturale 2018-19

Les informations phytotechniques importantes de l'essai mené lors de la saison 2017-18 sont précisées dans tableaux 8 et 9.

En 2019, de nombreux pics d'infection ont été enregistrés entre le stade 32 et la floraison ce qui a permis un développement conséquent de la septoriose sur les derniers étages foliaires des deux variétés (figure 11). La rouille brune s'est développée en fin de saison pour atteindre le 3 juillet, 9 % et 18% sur les F1 de Henrik et Mentor respectivement.

L'essai pour la dernière saison du projet consistait à comparer l'efficacité de différents traitements sur la septoriose et d'évaluer l'impact de ces traitements sur la sélection des souches résistantes.

Tableau 8. Informations phytotechniques de l'essai belge EUORES 2017-2018

Lieu	Thy-le-Château
Variété	Henrik/Mentor
Date de semis	11/10/2018
Densité (grain/m ²)	270 g/m ²
Précédent	Lin
Date de récolte	30/07/2019
Coordonnées gps	50.280038//4.432199

Tableau 9. Date de traitement et stade observé pour l'essai belge EUORES 2017-2018

Traitement	ZGS voulu	Date	ZGS observé
1	32	29/04/2019	32-
2	39	22/05/2019	39
3	55	6/06/2019	61

Le menfentrifluconazole combiné au fluxapyroxad (BAS 750 01F) appliqué au stade 39 montre une efficacité sur la septoriose comparable aux programmes dits 'nationaux' qui eux comprennent 2 traitements. La fenpicoxamid combiné au prothioconazole (GF-3307) ainsi que l'Ascra Xpro (bixafen, fluopyram et prothiconazol) ont aussi permis un bon contrôle de la septoriose en un seul traitement (figure 12,13 et 14).

Cet essai souligne bien l'importance de l'association des familles fongicides pour lutter contre la septoriose (DMI + SDHI). L'utilisation de multisite améliore aussi le contrôle. Les nouvelles matières actives, bientôt disponibles offriront de perspectives réjouissantes pour le contrôle de la septoriose. Toutefois une bonne maîtrise de leur utilisation demeure indispensable pour éviter le développement rapide de la résistance.

EURORES trial field - Belgium 2019 - Disease development and climatic conditions

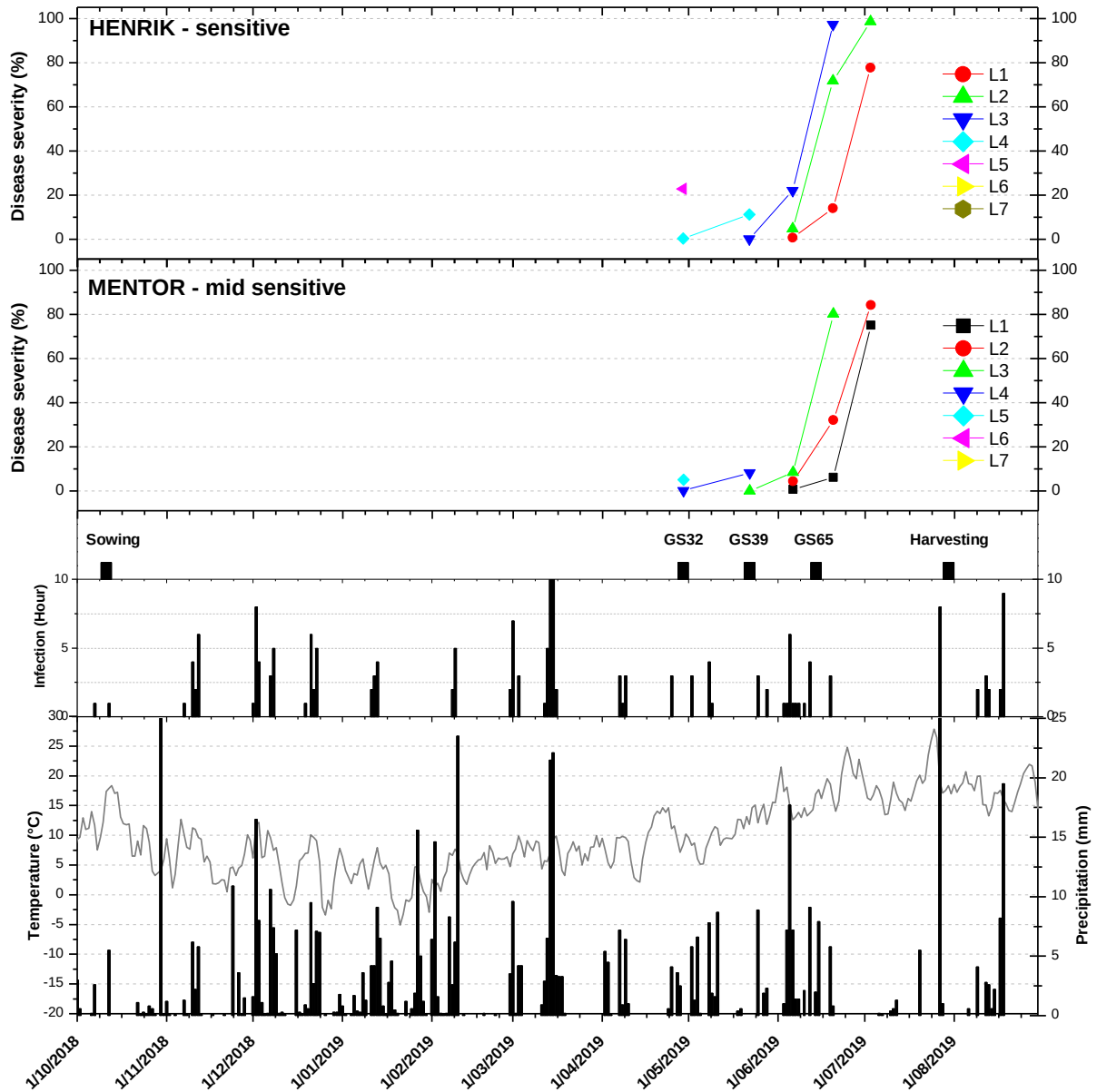


Figure 11. a) Sévérité de la septoriose sur les différents étages foliaire de la variété sensible Henrik et la variété mi-sensible Mentor. b) Développement phénologique du blé c) Nombre d'heure par jour propice à l'infection de la septoriose (proculture modifié par M. Duvivier) d) Température et précipitations mesurées à proximité de l'essai. Essai belge EURORES 2018-2019.

EURORES trial field - Belgium 2019 - STB symptoms - 03/07/2019

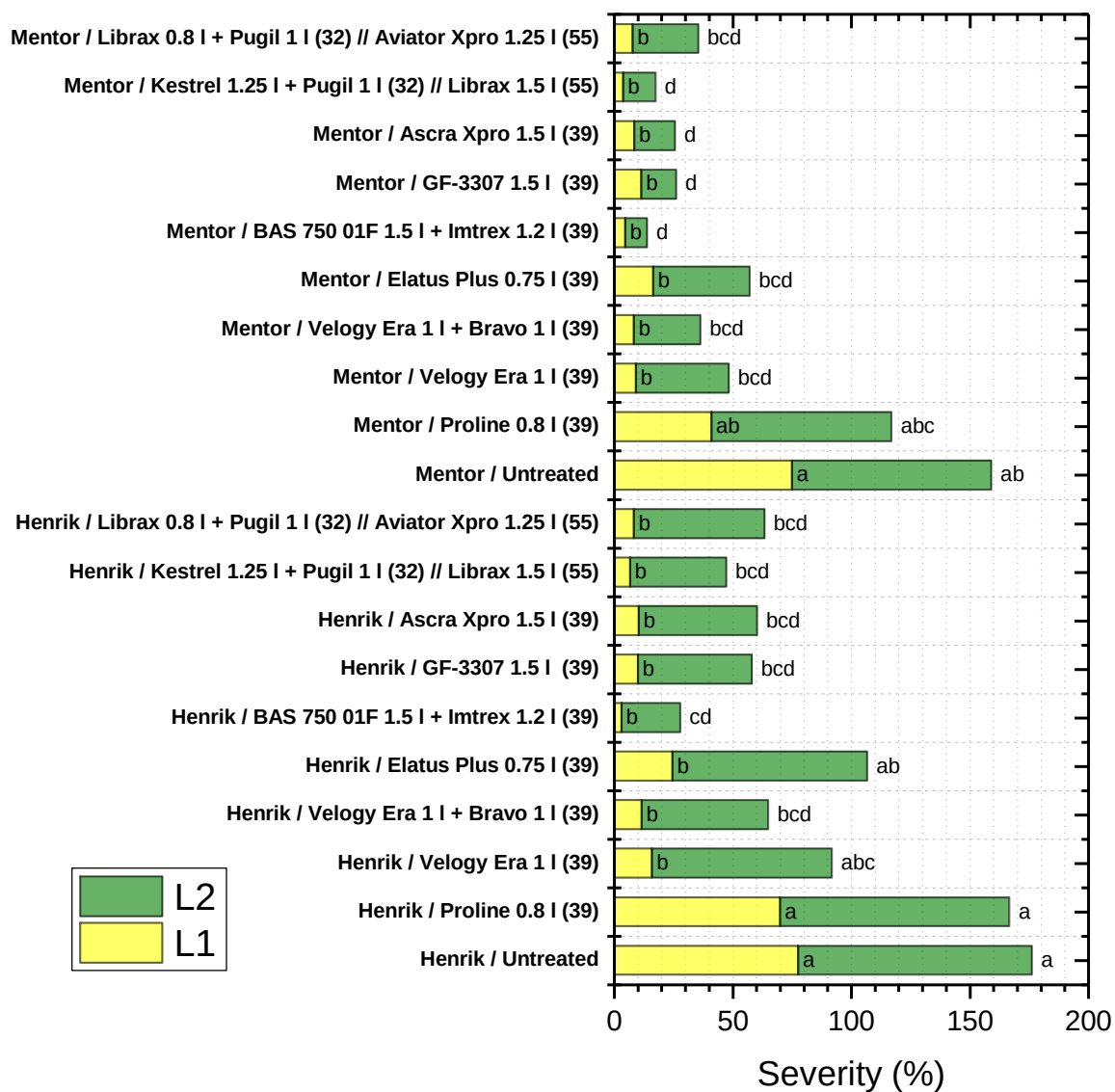


Figure 12. Sévérité de la septoriose sur les 2 derniers étages foliaires observée le 3 juillet 2019 dans l'essai belge EURORES 2018-2019 à Thy-le-Château.

EURORES trial field - Belgium 2019 - Green leaf area - 12/07/2019

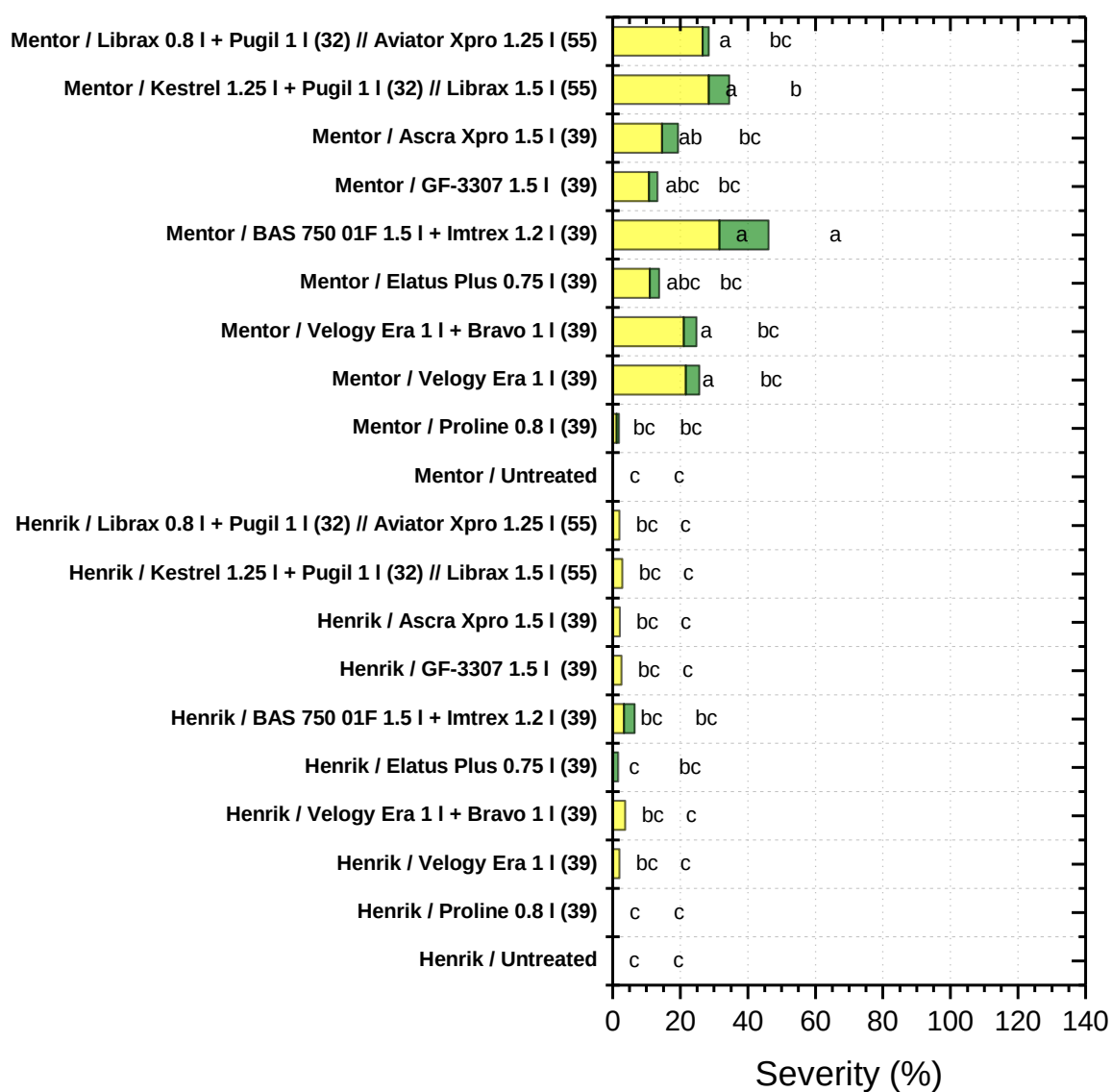


Figure 13. Surface verte observée sur les 2 derniers étages foliaires le 12 juillet 2019 dans l'essai belge EURORES 2018-2019 à Thy-le-Château.

EURORES trial field - Belgium 2019 - Yield (15% humidity)

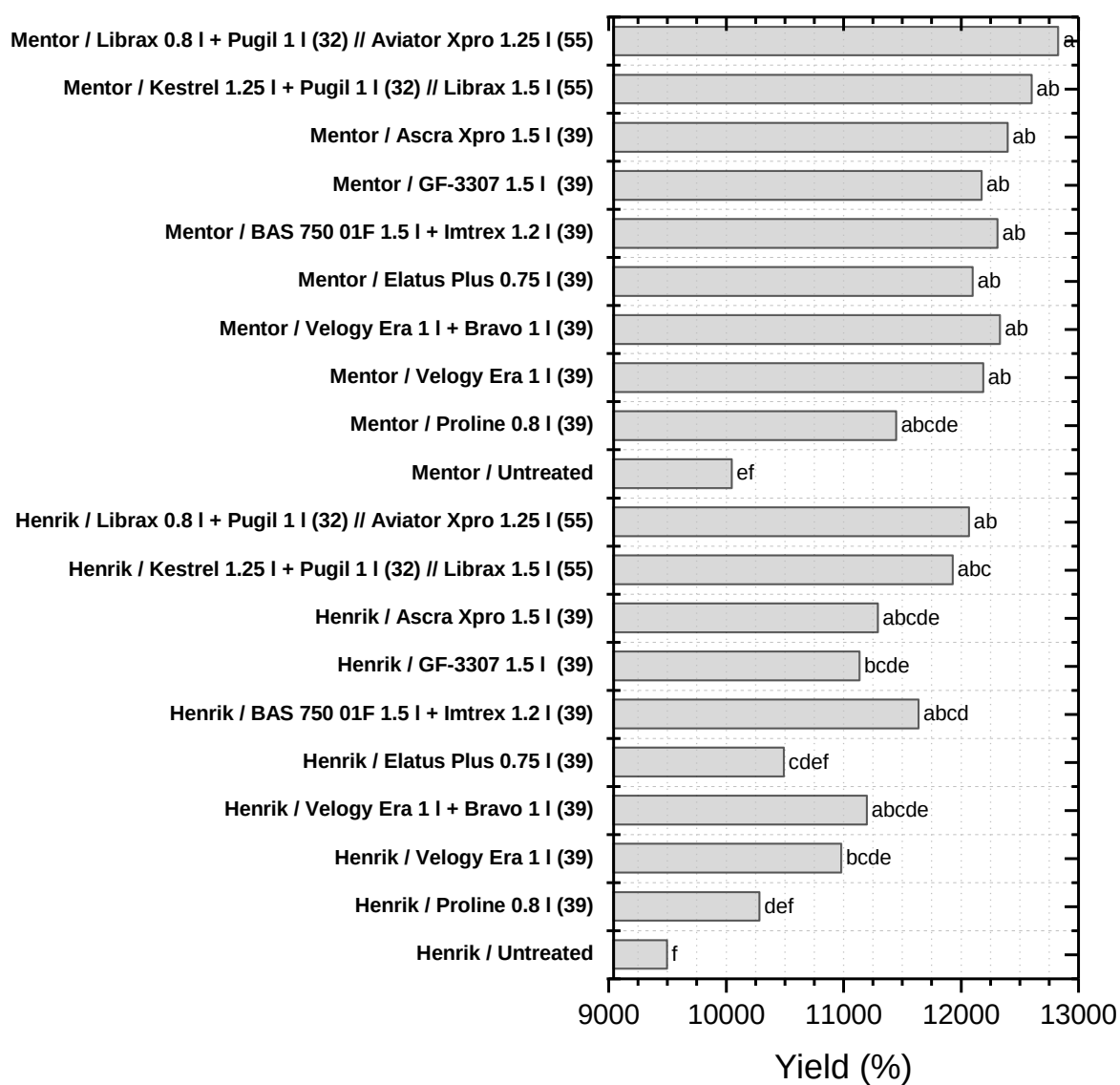


Figure 14. Rendements bruts mesurés dans l'essai belge EURORES 2018-2019 à Thy-le-Château.

5.3. Développement d'outils moléculaires

Pour étudier la distribution spatiale et temporelle des résistances chez *Z. tritici*, trois outils de détection quantitative ont été mis au point. Les tests moléculaires mis en œuvre se basent sur les polymorphismes génétiques (mutations) entre les individus sensibles et résistants pour quantifier, de manière spécifique, leur présence dans un échantillon contenant un mélange d'ADN de septoriose inconnu (ex. échantillons provenant d'un capteur de spores ou feuilles avec symptômes). Trois PCR quantitatives (qPCR) ont été développées et validées. La première qPCR permet de détecter les 2 variants alléliques S524T du gène CYP51 (résistance aux triazoles) et H152R du gène Sdh-C (résistance aux SDHI). Celle-ci et certains résultats ont déjà été publiés dans le journal peer review Plant Pathology (Hellin et al., 2020 <https://doi.org/10.1111/ppa.13252>). L'article complet est disponible en annexe 8.2. Le schéma ci-dessous permet de visualiser facilement le fonctionnement de cette méthode de quantification des allèles (figure 15).

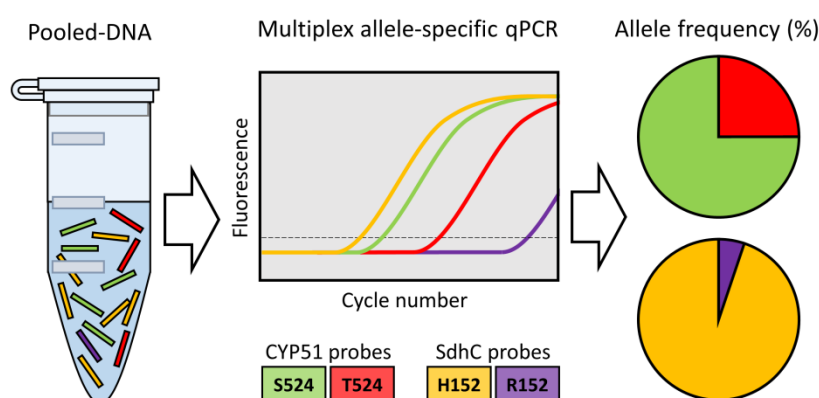


Figure 15. Résumé graphique du fonctionnement de la méthode de quantification des fréquences des allèles H152R et S524T dans des échantillons contenant de l'ADN de septoriose.

La deuxième méthode utilise le même principe pour quantifier les variants alléliques T79N/I (résistants aux SDHI). La troisième méthode permet, quant à elle, de détecter la mutation N86S du gène Sdh-C (résistances aux SDHI). Les protocoles pour les 2 dernières méthodes sont disponibles en annexe 8.3.

5.4. Fréquences des mutations H152R, N86S et T79N et S524T dans les populations de *Z. tritici* collectées en champs

5.4.1. Préparation des échantillons

Afin de mesurer les fréquences des mutations dans les populations de septoriose présentes dans des feuilles de blé, une procédure d'extraction d'ADN de septoriose sur feuille a été mise au point. Des symptômes de septoriose (nécrose avec pycnides) ont été prélevés à l'emporte-pièce de 5 mm sur chacune des feuilles des échantillons récoltés (figure 16). Au total 10 morceaux de feuilles ont été placés dans un tube et au moins 4 tubes ont été analysés par champ, le but étant d'analyser un minimum d'échantillons par champ mais d'avoir un

échantillonnage représentatif du champ. Ces morceaux de feuilles ont été lyophilisés, broyés au Fast prep avec une bille en verre et l'ADN a été extrait avec un kit du commerce.

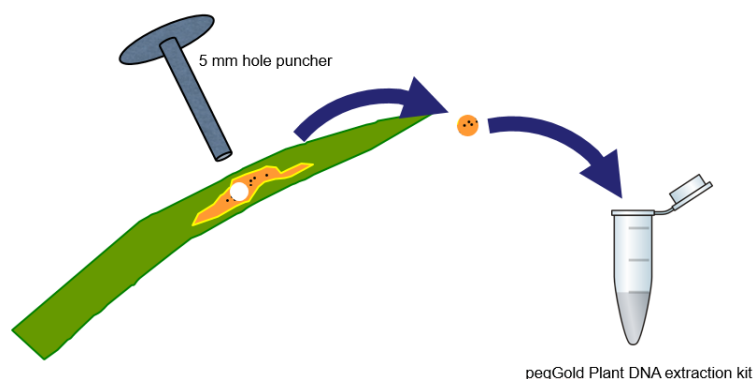


Figure 16. Schéma d'échantillonnage de lésion de septoriose pour l'extraction ADN.

En utilisant les 3 qPCR, les proportions des mutants ont pu être déterminées pour des échantillons d'ADN obtenus à partir de feuilles présentant des symptômes de septoriose récoltées à travers l'Europe en mars-avril 2019. Ceci a permis de créer des cartes de fréquences de mutations conférant la résistance au SDHI et au DMI à l'échelle de la Belgique mais aussi de l'Europe.

5.4.2. Cas de la Belgique

La carte suivante montre pour exemple la dispersion de la mutation S524T en Belgique occasionnant une forte résistance aux DMIs (figure 17). Cette mutation semble également dispersée sur le territoire belge. Les échantillons ont été récoltés en avril 2019 dans des champs d'agriculteurs avant que les traitements fongicides ne soient effectués. Sa fréquence dans la population belge a été estimée à 14%. Les fréquences de mutation N86S et T79N (mutants SDHI) dans la population belge ont été estimées 3.6% et 1.5% respectivement. La mutation H152R conférant une résistance quasi-totale aux SDHI a été détectée dans 4 champs sur 14 à très faible fréquence >0.1%.

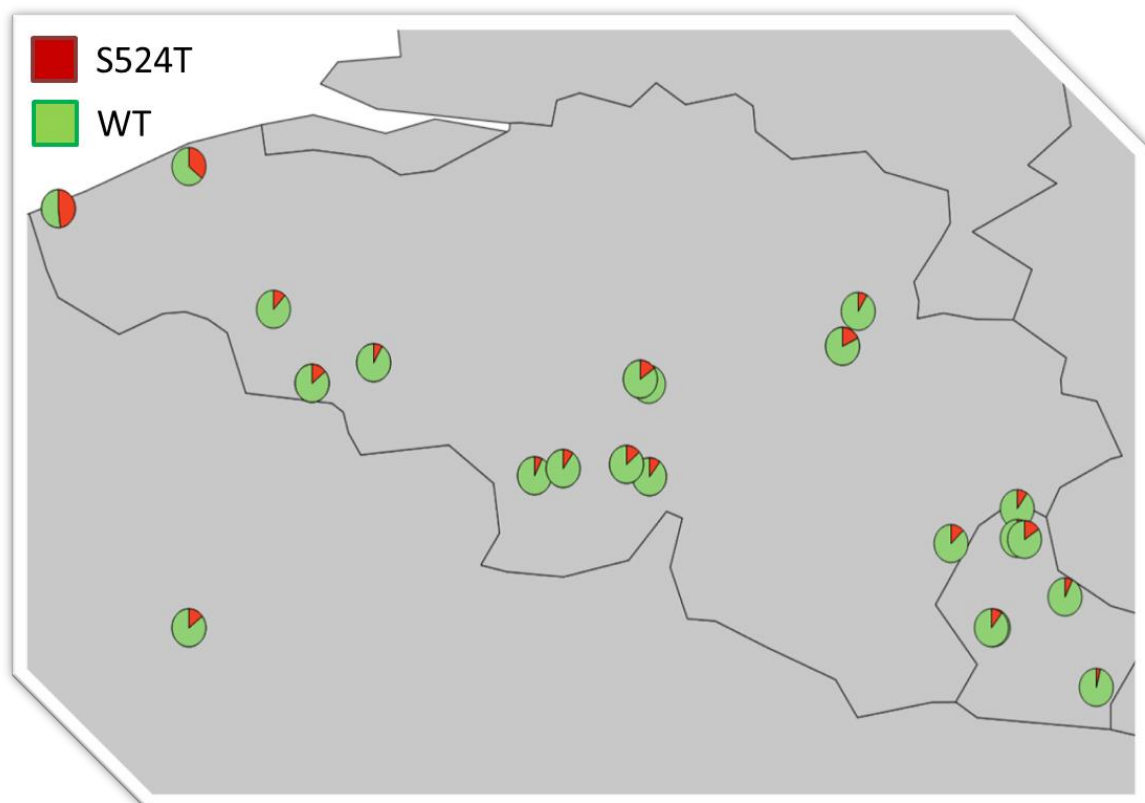


Figure 17. Fréquences de la mutation S524T quantifiées dans des échantillons de feuilles prélevés dans des champs d'agriculteurs en Belgique en avril 2019 avant l'application d'un quelconque traitement fongicide.

5.4.3. Carte pour l'Europe

A l'échelle européenne, les 2 figures suivantes (18 et 19) illustrent bien les différences observées entre pays pour les différentes mutations quantifiées.

L'Ecosse et l'Irlande montrent des fréquences de mutations plus importantes encore que la Belgique, la France et l'Allemagne. En revanche, la situation dans les pays nordiques semble moins préoccupante. Les résultats finaux pour l'ensemble des mutations quantifiées en Europe lors de la saison 2019 seront disponibles dans un article en cours de rédaction. La mutation H152R a été détectée en Belgique, Allemagne, Ecosse et Irlande.

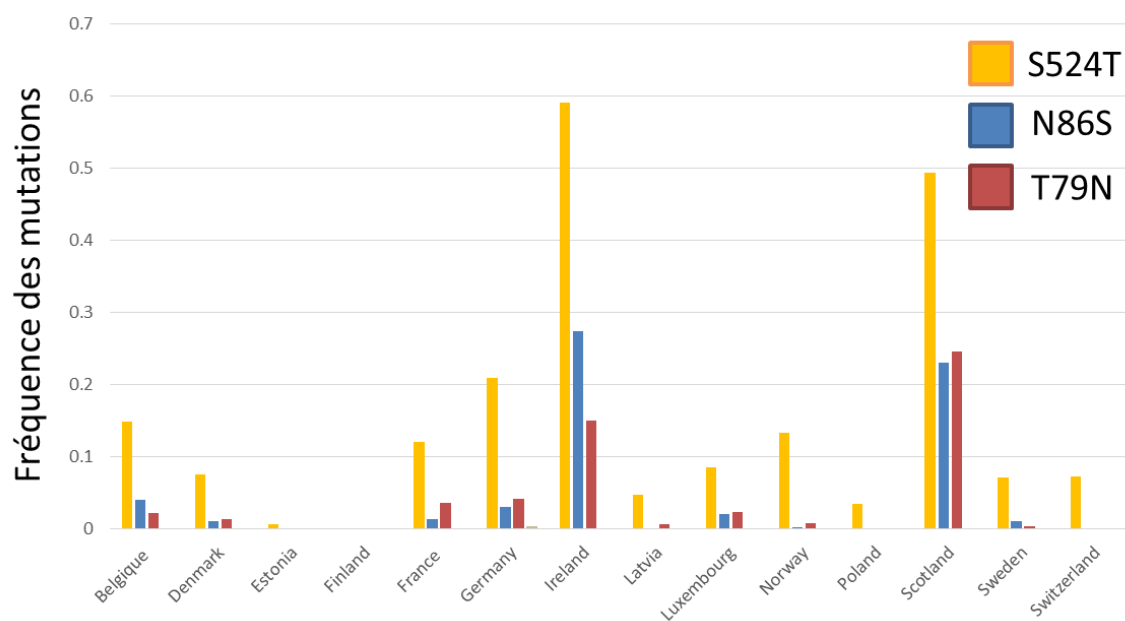


Figure 18. Fréquence des mutations S524T, N86S et T79N quantifiées dans des échantillons de feuilles prélevés dans des champs d'agriculteurs en Europe en avril 2019 avant tout traitement fongicide en champs.

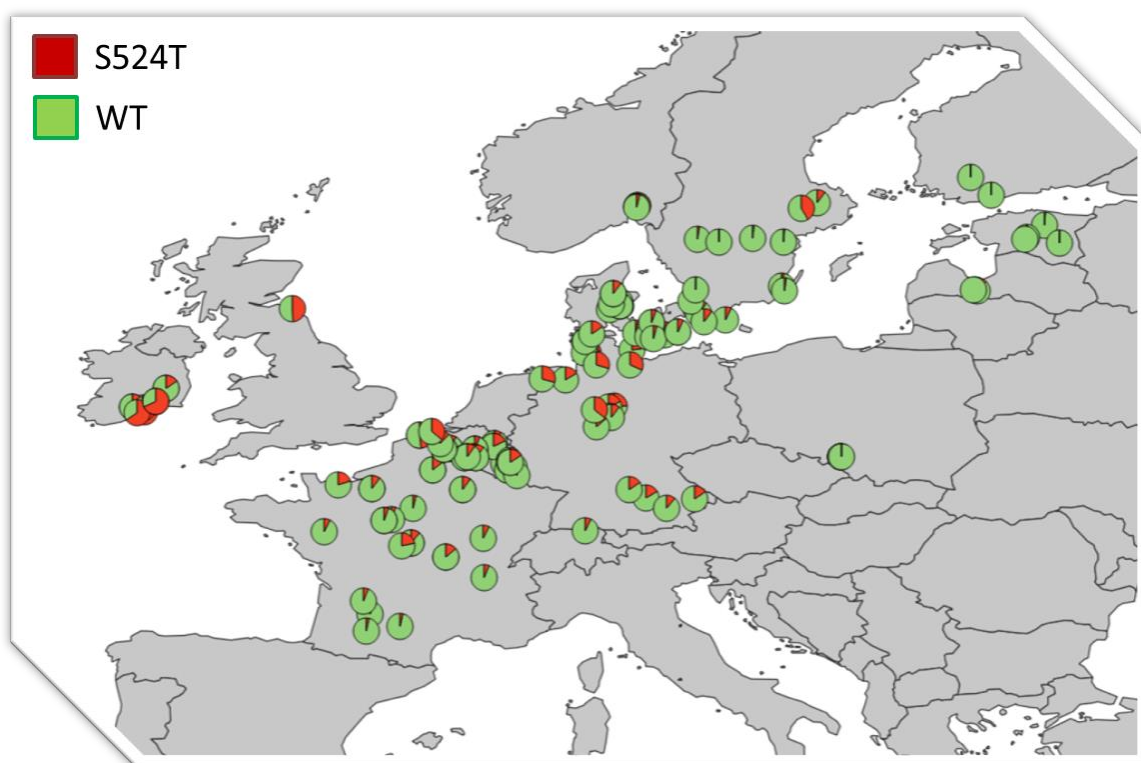


Figure 19. Fréquence de la mutation S524T quantifiée dans des échantillons de feuilles prélevés dans des champs d'agriculteurs en Europe en avril 2019 avant tout traitement fongicide en champs.

5.4.4. Impact des traitements fongicides en saison sur l'évolution des fréquences de résistances

Les 3 outils développés ont essentiellement été utilisés pour quantifier les fréquences de résistances, basées sur 4 mutations, dans des échantillons récoltés avant les traitements fongicides des agriculteurs. Néanmoins, une autre série d'échantillons a aussi été récolté après les programmes fongicides. Les fréquences obtenues pour les 4 mutations ont pu être comparées (figure 20). Une nette augmentation des fréquences est observée surtout pour les 3 mutations (N86S, T79N et H152R) concernant la résistance au SDHI. La mutation H152R est nettement plus présente après que les traitements aient été effectués. Toutefois, il semblerait que les souches portant la mutation H152R ne survivent pas bien à l'hiver probablement en raison d'un coût fitness élevé lié à cette modification.

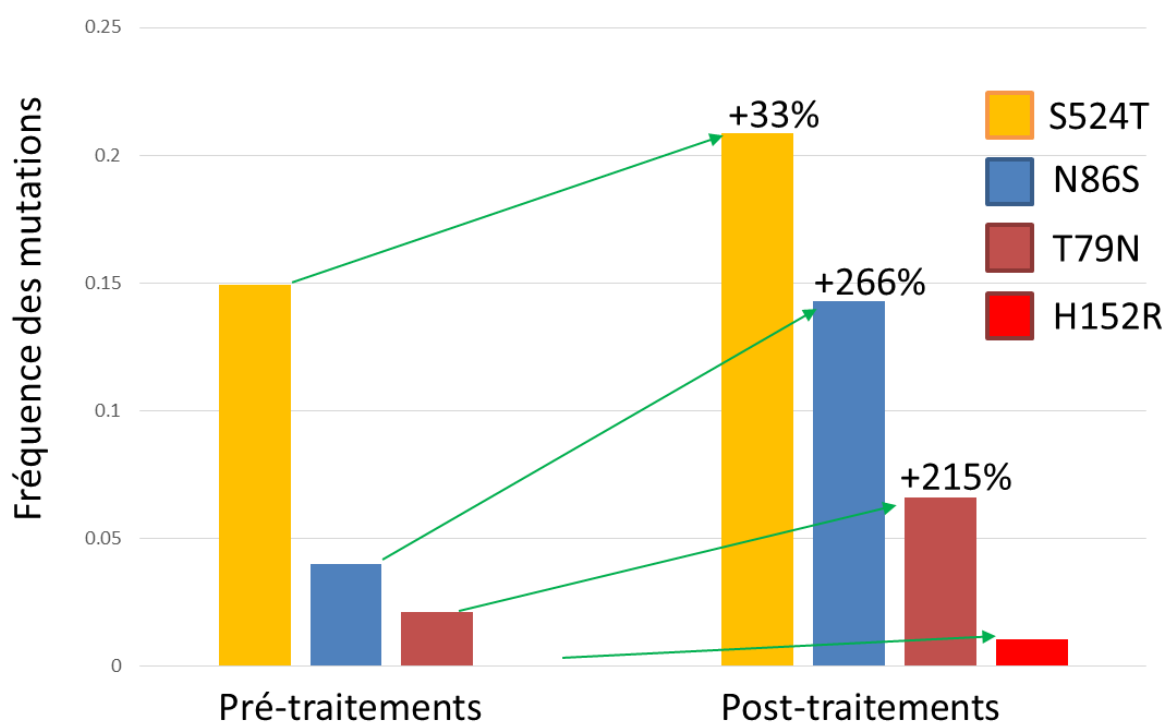


Figure 20. Moyenne des fréquences des mutations S524T, N86S, T79N et H152R quantifiées dans des échantillons de feuilles prélevés dans des champs en Belgique avant et après les programmes fongicides (N=8).

5.4.5. Sensibilité variétale et sélection de résistance

Les fréquences des mutations observées sur les échantillons récoltés sur des variétés sensibles ont été comparées à celles obtenues à partir des échantillons récoltés sur des plantes résistantes et contenant le gène *stb6* (figure 21). Les échantillons ont tous été récoltés en avril 2019 avant que les premiers traitements fongicides ne soient appliqués. Pour les trois mutations (S524T, N86S et T79N), des fréquences nettement inférieures ont été relevées sur les variétés résistantes. La mutation H152R n'a pas été observée dans ces échantillons. Ces résultats innovants renforcent encore plus l'idée que l'utilisation de variété résistante serait le premier pilier dans la gestion du développement de résistance chez la septoriose du blé.

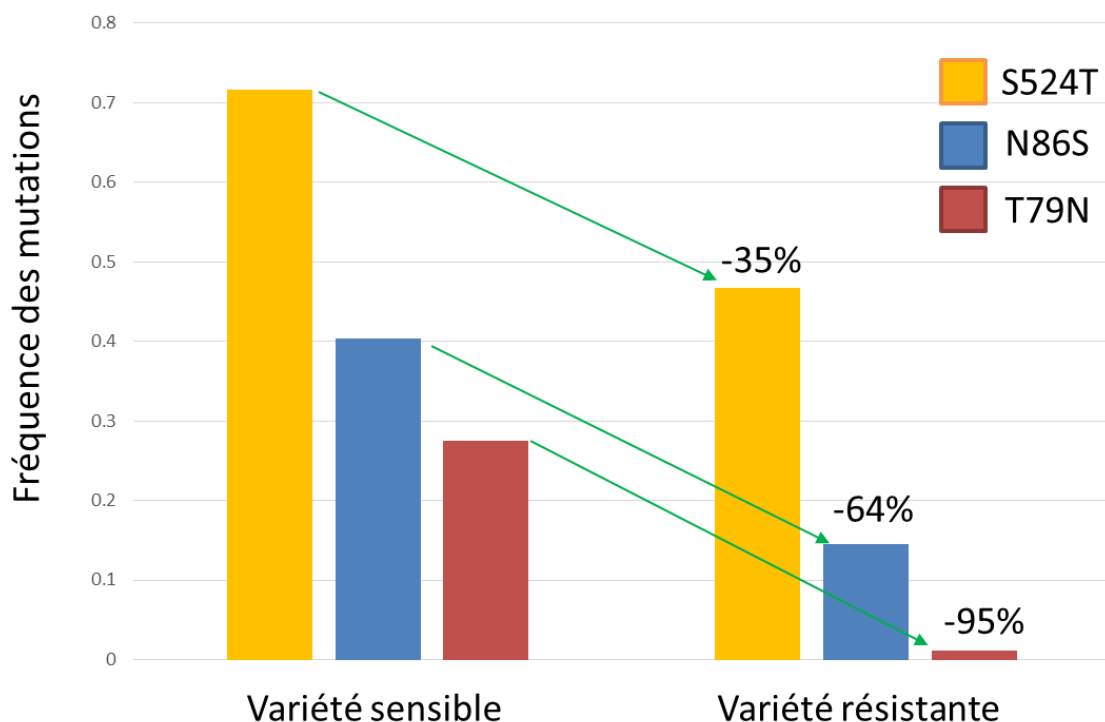


Figure 21. Moyenne des fréquences des mutations S524T, N86S et T79N quantifiées dans des échantillons de feuilles prélevés avant tout traitement (avril 2019) sur des variétés sensibles (N=5) et résistantes (N=5) en Irlande.

5.5. Suivi des populations par le captage de l'inoculum aérien de *Z. tritici* par des pièges à spores

5.5.1. Échantillonnage

En 2017 et en 2018, deux capteurs par pays ont échantillonné l'air en continu dans 2 champs de blé du 1 septembre au 30 novembre. Dans chaque pays, un capteur était installé sur le champ où l'essai fongicide était mis en place et l'autre à minimum 100 km, dans un champ d'agriculteur. Par capteur, 91 échantillons journaliers devaient donc en principe être obtenus par année. Les protocoles nécessaires à la mise en place des capteurs, la préparation des bandes, la découpe des bandes et la conservation de toutes informations utiles ont été rédigés par le CRAW (annexe 8.1). Tous les échantillons journaliers des capteurs pour tous les pays membres ont, chaque année, été rapatriés au CRAW pour procéder aux extractions d'ADN. Les échantillons d'ADN ont ensuite été acheminés à l'UCL pour les analyses.

En Belgique, les 2 capteurs de spores ont été placés à Thy-le-Château et à Voroux-Goreux du 1^{er} septembre au 30 novembre en 2017 et en 2018. Cette période avait été choisie pour cibler l'inoculum primaire de *Z. tritici*.

5.5.2. Détections de mutations dans l'inoculum aérien

Dans tous les échantillons disponibles, la quantité d'ADN de septoriose a d'abord été estimée pour chaque échantillon en utilisant une version modifiée de la méthode développée précédemment par Duvivier *et al.* (2013). Cette quantité totale, exprimée en ascospores, est représentée par la ligne noire sur la figure 22 qui montre pour exemple les résultats obtenus en

Suède à Sandby Gard en 2017. Les graphiques pour les autres capteurs sont disponibles à la fin de l'article publié dans Plant Pathology en annexe 8.2. L'ensemble de données est aussi résumé dans le tableau 10.

L'inoculum aérien de *Z. tritici* a été détecté dans tous les champs échantillonnés, avec des fréquences de détection journalière d'inoculum variant de 39% à 91% au cours de la période d'échantillonnage (septembre à novembre). La quantité moyenne d'ascospores piégées variait considérablement entre les champs avec plus de 10 000 ascospores m⁻³ détectés à Lönnstorp (Suède) en 2017. Les quantités d'ascospores captées variaient grandement entre les deux saisons et selon le pays (annexe 8.2 figure S2). Par exemple, en Belgique, les niveaux d'inoculum étaient plus élevés en 2018 qu'en 2017, alors que l'inverse a été observé en Suède. Chaque échantillon dans lequel de l'ADN de *Z. tritici* a été détecté en quantité suffisante (300 ascospores m⁻³ day⁻¹) a ensuite été testé pour quantifier la proportion des allèles mutants S524T et H152R. Des fréquences alléliques dans l'inoculum aérien ont pu être déterminées à partir de tous les champs échantillonnés, sauf à Lönnstorp (Suède) en 2018, où les quantités quotidiennes d'ADN de *Z. tritici* capturées étaient toujours trop faibles. Un total de 209 échantillons a été testé avec le test qPCR.

La mutation H152R n'a été détectée dans aucun des échantillons testés. La substitution S524T a, quant à elle, été couramment détectée et le test qPCR a permis de surveiller la dynamique temporelle dans les échantillons d'inoculum aérien. La proportion d'allèle S524T est indiquée par des barres colorées situées sous la courbe noire (figure 22 et annexe 8.2 figure S2). Toutefois, pour environ 30% de ces échantillons, les signaux de fluorescence n'étaient pas interprétables (c'est-à-dire faibles, incohérents ou absence de signal) même après avoir testé une deuxième fois ces échantillons.

Des différences de fréquences de S524T ont été observées entre les champs, allant de 0 à 100% (tableau 10). Le nombre d'échantillons avec des résultats interprétables variait également considérablement d'un site à l'autre et était compris entre 1 et 42 et une moyenne pondérée a donc été calculée pour chaque pays. Sur base de cette information, une fréquence plus élevée de S524T a été trouvée en Irlande, où environ un tiers des ascospores détectées portaient la substitution S524T. La fréquence du S524T a été évaluée à 26,3% en Belgique, soit plus du double de celle observée en Suède (13,3%), tandis qu'au Danemark, seulement 8,2% des spores portaient la substitution S524T. À l'échelle du champ, de grands changements dans la fréquence du S524T pouvaient parfois être observés d'un jour à l'autre (exemple à Sandby Gård, Suède en 2017; figure 22). Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre les fréquences de l'allèle S524T et les quantités d'ascospores de *Z. tritici*.

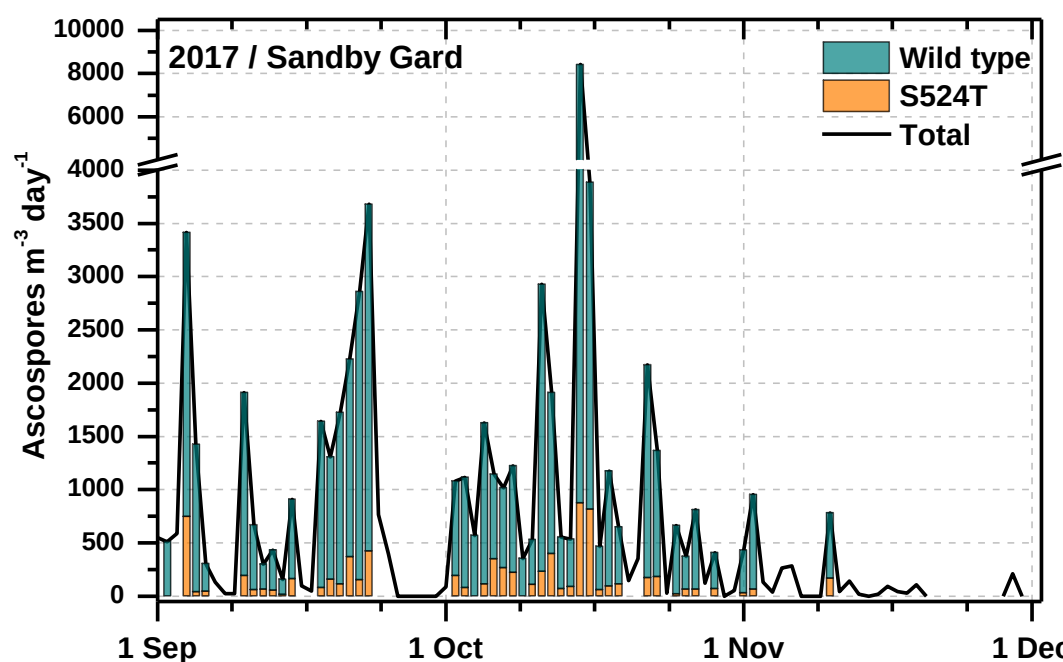


Figure 22. Détections journalières de l'inoculum aérien de *Zymoseptoria tritici* (ascospores $\text{m}^{-3} \cdot \text{jour}^{-1}$) dans un champ de blé situé à Sandby Gård (Suède) du 1^{er} septembre au 30 novembre 2017. Les barres empilées représentent la proportion d'allèles S524T (en orange) par rapport au total d'inoculum de *Z. tritici* piégées.

Tableau 10. Vue d'ensemble de la détection de l'inoculum aérien de *Z. tritici* et des fréquences des allèles S524T obtenue dans le réseau européen de capteurs de spores du 1^{er} septembre au 30 novembre en 2017 et 2018.

Country	Year	Site	Ascospores ^a				Frequency of S524T		
			Data ^b	Detection	Mean	Maximum	Data ^c	Mean	Maximum
			n	%	m ⁻³ day ⁻¹	m ⁻³ day ⁻¹	n	%	%
Belgium	2017	Thy-le-Château	91	62.6	45.8	361.6	0	-	-
		Voroux-Goreux	90	44.4	61.3	1076.5	1	0.0	0.0
	2018	Thy-le-Château	90	76.7	262.3	3762.2	14	23.1	62.9
		Voroux-Goreux	91	60.4	76.9	825.7	3	50.1	100.0
	Total		362	61.0	111.3		18	26.3	
Denmark	2017	Flakkebjerg	89	76.4	154.8	1402.2	13	12.4	42.0
		Horsens	38	18.4	11.1	162.6	0	-	-
	2018	Flakkebjerg 1	90	72.2	152.1	1319.7	9	2.8	10.0
		Flakkebjerg 2	90	88.9	843.5	4547.4	35	8.0	60.2
	Total		307	64.0	338.1		57	8.2	
Ireland	2017	Grange	91	91.2	236.1	1423.5	6	28.3	40.0
		Gurteen	79	64.6	81.3	1452.0	3	46.3	100.0
		Oak Park	28	78.6	91.2	415.0	2	31.0	38.2
	Total		198	78.1	153.8		11	33.7	
Sweden	2017	Lönnstorp	85	68.2	501.6	10528.1	15	12.2	31.7
		Sandby Gård	84	84.5	778.8	8424.9	42	12.3	30.5
	2018	Lönnstorp	41	39.0	9.5	80.9	0	-	-
		Sandby Gård	81	76.5	115.1	3394.8	2	44.5	77.5
	Total		291	67.1	404.7		59	13.3	

^a The number of ascospores $\text{m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ were estimated on the basis of the number of DNA copies measured by qPCR, considering that two copies were present in each ascospore (2-cell spore) and the daily air intake of the sampler of $14.4 \text{ m}^3 \text{ day}^{-1}$.

^b Number of days for which air samples were collected

^c Number of air samples, with a *Z. tritici* content higher than ascospores $\text{m}^{-3} \text{ day}^{-1}$, for which an estimation of the proportion of S524T mutation could be accurately made

5. Tâches et livrables pour l'équipe belge

A ce stade, la Belgique (CRAW et UCL) a rempli toutes ses tâches et ses missions pour le bien du projet. Elle a aussi généré plusieurs livrables.

La Belgique a mis en place 3 nouveaux outils rapides et fiables pour quantifier les fréquences de mutations conférant des résistances aux triazoles et aux SDHI. Ces outils seront désormais utilisés par le réseau EUROWHEAT. Une des méthodes a déjà été publiée par l'équipe belge.

La Belgique a créé les protocoles relatifs à la mise en place du réseau de capteurs. Elle a supervisé le fonctionnement du réseau. L'ensemble des bandes de captage provenant du réseau de capteurs ont été traités par les équipes belges.

La Belgique a mis en place 3 essais pour les besoins du projet. Un quatrième essai a même été mis en place en 2020 pour compléter les résultats.

La Belgique a organisé un des meetings annuel du projet qui a eu lieu à Louvain-La-Neuve le 11 et 12 octobre 2018.

La Belgique a toujours envoyé au moins un représentant aux 2 réunions annuelles des partenaires.

Enfin, l'équipe belge est en train de finaliser un deuxième article intitulé : Distribution géographique des différentes mutations conférant la résistance aux triazoles (S524T) et aux SDHI (T79N, N86A et H152R) chez la septoriose en Europe et impact sur l'efficacité des produits au champ.

6. Valorisation scientifique

6.1. Equipe belge

1. Un article scientifique portant sur la méthode de quantification des mutations S524T et H152R a été accepté pour publication dans *Plant Pathology* (Juillet 2020). Le travail derrière cet article ainsi que sa rédaction ont principalement été réalisés par l'équipe belge.

Multiplex qPCR assay for simultaneous quantification of CYP51-S524T and SdhC-H152R substitutions in European populations of *Zymoseptoria tritici*

Hellin P.^{1,2}, Duvivier M.¹, Clinckemaillie A.¹, Bataille C.¹, Legrève A.², Heick T.M.³, Jørgensen L.N.³, Andersson B.⁴, Samils B.⁴, Rodemann B.⁵, Berg G.⁶, Kildea S.⁷

¹Plant and Forest Health Unit, Walloon Agricultural Research Center, Rue du Bordia 11, 5030 Gembloux, Belgium

²Applied Microbiology, Earth and Life Institute, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2 box L7.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

³Department of Agroecology, Aarhus University, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse, Denmark

⁴Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, PO Box 7026, SE-750 07 Uppsala, Sweden

⁵Department of Mycology and Virology, Julius Kühn-Institut, Messeweg 11/12, D-38104, Braunschweig, Germany

⁶Plant Protection Centre, Swedish Board of Agriculture, Box 12, Alnarp, SE 230 53, Sweden

⁷TEAGASC, The Agriculture and Food Development Authority, Oak Park, Carlow, Ireland

2. Un deuxième article scientifique portant sur la distribution spatiale des mutations clés conférant à la septoriose de la résistance aux fongicides est en cours de finalisation. Le travail

derrière cet article a aussi principalement été réalisé par l'équipe belge. Il sera normalement soumis fin d'année 2020.

Geographical distribution of key mutations conferring fungicide resistance to *Zymoseptoria tritici* in Europe

3. Un abstract a été soumis pour participer au 72ème International Symposium on Crop Protection de Ghent (Mai 2020). Néanmoins, le symposium a été reporté suite à la crise sanitaire

Determination of the fungicide resistance status of *Zymoseptoria tritici* in Europe using allele-specific qPCR assays

Hellin P.¹, Duvivier M.¹, Clinckemaillie A.¹, Bataille C.¹, Chandelier A.¹, Legrève A.², Heick T.M.³, Jørgensen L.N.³, Andersson B.⁴, Samils B.⁴, Rodemann B.⁵, Berg G.⁶, Kildea S.⁷

¹Plant and Forest Health Unit, Walloon Agricultural Research Center, Rue du Bordia 11, 5030 Gembloux, Belgium

²Applied Microbiology, Earth and Life Institute, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2 box L7.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

³Department of Agroecology, Aarhus University, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse, Denmark

⁴Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, PO Box 7026, SE-750 07 Uppsala, Sweden

⁵Department of Mycology and Virology, Julius Kühn-Institut, Messeweg 11/12, D-38104, Braunschweig, Germany

⁶Plant Protection Centre, Swedish Board of Agriculture, Box 12, Alnarp, SE 230 53, Sweden

⁷The Agriculture and Food Development Authority, Oak Park, Carlow, Ireland

Septoria leaf blotch (STB), caused by *Zymoseptoria tritici*, is one of the most important disease occurring on wheat in Europe. Due to the constant use of fungicides to control STB and other wheat diseases, resistance has emerged in *Z. tritici* populations. Demethylation inhibitors (DMI) and succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) are currently the most used fungicide groups on wheat. Resistances to these molecules are suspected to be spreading eastwards through Europe, with Ireland and the UK heavily suffering from control issues due to resistance. In the framework of the EURORES project, multiple allele-specific qPCR assays have been developed to quickly and efficiently determine the proportions of the most problematic mutations affecting DMIs (CYP51 S524T) and SDHIs (Sdh-C T79N, N86S and H152R). These assays were successfully used on leaf samples collected in European wheat fields in the spring of 2019. The preliminary results show large differences between European countries with regard to all mutation frequencies. These differences may largely explain the differences in fungicide efficacies observed throughout Europe and urge the need for proper resistance management solutions.

4. Une présentation a été réalisé au 19th International Reinhardtsbrunn Symposium : Modern Fungicides and Antifungal Compounds en avril 2019

Tracking the spread of key mutations in *Zymoseptoria tritici* conferring resistance to the DMI and SDHI fungicides.

Hellin P., Duvivier M., Clinckemaillie A., Bataille C., Legrève A., Jørgensen L.N., Hansen J.G., Heick T.M., Andersson B., Samils B., Rodmann B., Berg G. & Kildea S.

Currently control of septoria tritici blotch caused by *Zymoseptoria tritici* in northern Europe is highly dependent on the application of fungicides; in particular those belonging to the demethylation inhibitor (DMI) and succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicide groups. Unfortunately resistance to both groups of fungicides has emerged and is suspected to be spreading eastwards through Europe. Whilst varying levels of resistance have been detected, two key mutations, S524T in the CYP51 and H152R in SDHC gene have been identified as the most problematic for both the DMIs and SDHI respectively. In order to monitor the distribution and spreading of these two mutations, a multiplex qPCR assay was

developed in the framework of the European consortium EURO-RES. The method has been shown to be highly sensitive and specific for each mutation. It has been successfully used to genotype strains, estimation of allele proportions from pooled field samples and airborne samples from Burkard spore traps. The preliminary results show large differences between European countries with regard the S524T frequency, consistent with differences in sensitivity observed to the azole fungicides. Fortunately, SDHC-H152R does not appear to be widespread and has only been detected at extremely low frequencies.

6.2. Autres équipes du projet

Un rapport global va être réalisé par le coordinateur du projet S. Kildea.

Trois articles scientifiques supplémentaires sont en cours de finalisation :

- Evaluation en Europe de la sélection de résistances et de l'efficacité aux champs des traitements fongicides sur blé selon le timing d'application et les combinaisons de fongicides utilisées
- Etude de la diversité génétique des populations de septoriose irlandaises grâce au développement d'une nouvelle méthode de séquençage à haut débit (PAC-Bio)
- Utilisation du PAC-Bio dans l'étude de l'évolution des populations de septoriose en Europe et implication sur l'apparition des résistances aux fongicides et leur propagation

7. Références

- Brunner, P.C., Stefanato, F.L. and MC Donald, B.A.** (2008) Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 305–316.
- Cools, H.J. and Fraaije, B.A.** (2013) Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag. Sci.* **69**, 150–155.
- Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J. and Kildea, S.** (2016) Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the *SdhC* -H152R and *SdhD* -R47W substitutions. *Pest Manag. Sci.* **72**, 2203–2207.
- Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J. and Kildea, S.** (2016) The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zymoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity. *Pest Manag. Sci.* **72**, 1150–1159.
- Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., Proft, M. De, Moreau, J.-M. and Legrève, A.** (2013) Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* **137**, 325–341.
- Fraaije, B., Cools, H. and Fountaine, J.** (2005) Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*.
- Germer, S., Holland, M.J. and Higuchi, R.** (2000) High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.* **10**, 258–66.
- Grimmer, M.K., Bosch, F. van den, Powers, S.J. and Paveley, N.D.** (2015) Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest Manag. Sci.* **71**, 207–215.
- Kildea, S., Dunne, B., Mullins, E., Cooke, L.R., Mercer, P.C. and O'Sullivan, E.** (2010) Pyraclostrobin reduces germ tube growth of QoI-resistant *Mycosphaerella graminicola*

- pycnidiospores and the severity of *septoria tritici* blotch on winter wheat. *Plant Pathol.* **59**, 1091–1098.
- O’Driscoll, A., Kildea, S. and Doohan, F.** (2014) The wheat–Septoria conflict: a new front opening up? *Trends in plant science* **19**, 602–610.
- Okonechnikov, K., Golosova, O. and Fursov, M.** (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **28**, 1166–1167.
- Stammler, G. and Semar, M.** (2011) Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bull.* **41**, 149–155.
- Torriani, S. and Brunner, P.** (2009) QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag.Sc.* **65**, 155–162.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L.** (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134.

8. Annexes

8.1. Protocole d'installation et de gestion du réseau de capteurs

Protocole EURO-RES, WP2 Task 2.3 - Collection of airborne spores *Task lead: Walloon agricultural research Centre, Maxime Duvivier*

8.1.1. Sampling Period

- 1 September 2017 to 30 November 2017
- 1 September 2018 to 30 November 2018

Tips: Spore traps should be set up with drum inside on 31/08 in order to have a full “midnight to midnight” on 1st September

8.1.2. Where to set up spore traps?

- A total of 2 Burkard spore traps at the border of 2 winter wheat fields
Details
 - o 1 spore trap set up next to the field of the trial field
 - o The other spore traps next to a commercial field 80-100 km away minimum

8.1.3. How to set up the spore traps?

- To have the exact same conditions, make a free area of 3X3 meter using herbicides and place the spore trap in the center.

Tips: Use a mix of root and foliar herbicides (example: foliar → glufosinat; root: terbutylazine and flufenacet)

Tips: To make things easier (field work at this time) place the spore trap at the border of the field, ensure that no residue are present close to the spore trap. Make sure that the spore trap is not too close to a former wheat field with work in progress. It could generate dust containing mycelium and introduce false positive in the results.

- The opening of the spore trap should be place at 1 meter high.
2 solutions:
 - o **Easy one** : use a pallet assembling and bury the first one in the ground for stability
Screw the spore traps on it.
 - o **Technical one** : Design a special stand as on the following picture 1.
- **Power supply:** To avoid problems, use a heavy battery, at least 120 Ah / 12V, and replace it every two weeks or three weeks if not powered by solar panel. Make sure to have 2 batteries per spore trap. If you don't want to change the heavy battery every two weeks (and if sun is available in your country ☺), use a solar panel (50W / 12 V) and a load regulator to preserve your battery. Use a plastic box to protect your battery.



Picture 23

Reference of the cheapest and reliable websites with good quality products

<https://www.ase-energy.com/> (France)

Example of Battery:

<https://www.ase-energy.com/batterie-agm-100ah-effekta-btl12-100,fr,4,BATEFK100A.cfm>

Example of solar panel

<https://www.ase-energy.com/panneau-solaire-12v-50w-monocristallin,fr,4,PAN50W.cfm>

Example of load regulator

<https://www.ase-energy.com/regulateur-de-charge-solaire-12a-12v-24v,fr,4,REG12A.cfm>

8.1.4. How to make the tapes

- Use gloves
- Switch on the laminar flow cabinet 20 minutes before handling.
- Disinfect with alcohol the laminar flow cabinet, the scalpel, and the forceps.
- Disinfect with alcohol the carrying case and the drums
- Place the drum to be prepared on the bracket (drum holder) and adjust the locking nut.
- Place a small piece of double sided adhesive tape between the green line and the top black line of the tape (picture 2).

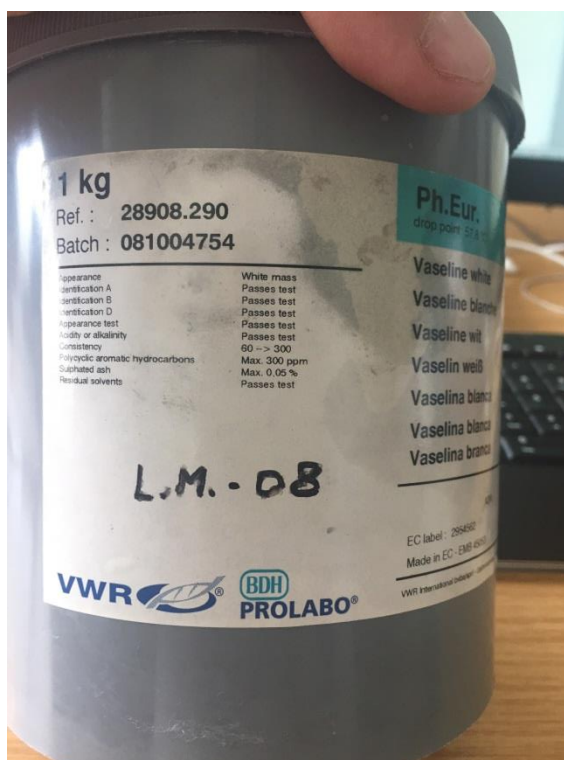


Picture 24

- Place the Melinex tape on the adhesive tape. Start at the middle black line. Roll up the Melinex tape around the drum and end at the middle black line. The two ends of the Melinex tape should meet without any gap at the middle black line and should be stuck to the double sided Scotch tape. Make sure the Melinex tape is well tight and not too loose anywhere around the drum.
- Place a very small amount of Vaseline White (VWR, BDH Prolabon PH. EUR. Drop point 57.8°C, ref :28908.290) on a paint brush (less larger than the tape) and spread around the tape. Use the handle on the stand to spin the drum while holding the brush. Once the grease is spread evenly, take a Tork paper and wipe off any excess grease on the sides of the tapes. You should be able to see a faint finger print but no excess grease. (Example of material: pictures 3 & 4).

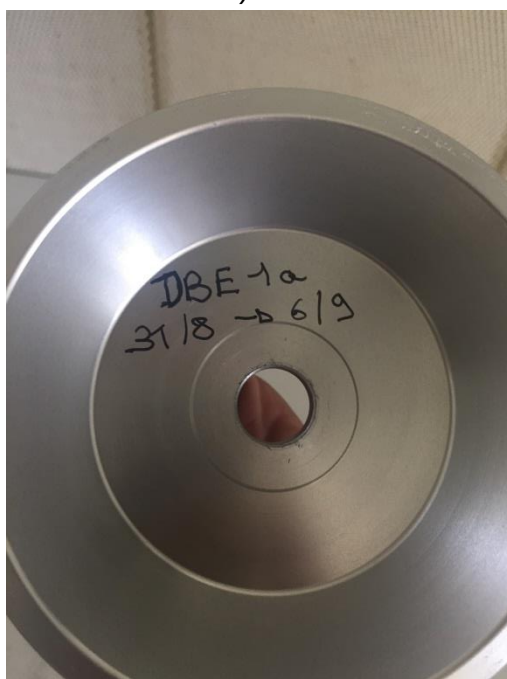


Picture 25



Picture 26

- Place the drum in a clean carrying case.
- Write the location, the ID of the drum on the boxes and behind the tapes and the date (Example picture 5 : D-BE1a 31/08 – 6/09)



Picture 27

- Store the carrying case containing the drums in the lab until use.

8.1.5. How to change the tapes

- Change the drums of the spore traps every 7 days at the same time; you have a buffer of 4 hours.

Tips: You can of course change the drums with a less longer increment if needed (work-free day...)

- Block the head of the spore trap with a pin to prevent the wind vane from swinging
- Check the flow with the adapted flow meter and record it on the form.
- If the flow is too low, check the battery voltage and the connections. If the voltage is less than 11.5V, change the battery. Check that the orifice is not clogged.

Tips: In some case you may have a motor problem, it is safer to always have a spare one with you. If you don't have it, I can help.

- Change the tape.
 - o Open the spore trap and check that the previous tape has returned closed to its original position. The red dash must return close to the arrow after 7 days. In case of incorrect position, measure the distance between the red dash and the arrow and report it on the form.
 - o Remove the drum by unscrewing the brass nut on the clock mounting spindle in an anti-clockwise direction. The drum should be held by the knurled flange in order to not foul the trapping surface. Place it in the carrying case with the right denomination.
 - o Check the cleanliness of the orifice and the inside of the spore trap, rub it if necessary using a Tork paper and alcohol.
 - o Wind-up the mechanism using the specially designed clock wind-up key

Tips: Be careful not to force the mechanism, count 17 one-half turn clock wind-up key

- o Place the new tapes with the red dash facing the arrow. Screw correctly the item to fix the tape.
 - Be absolutely certain that the red dash on the drum is line up with the metal arrow of the clock mounting spindle
 - o Close the spore trap
- Measure flow and calibrate flow if necessary using the screw allowing the control of the motor
 - o Remove the engine cover. Remove the bolt next to the motor to access the screw, tighten or loosen the screw to adjust the flow to 10 l / min using the flowmeter. Replace the bolt and the engine cover.
 - o Measure the suction flow again.

Tips: You can mark the start time with a needle in the orifice.

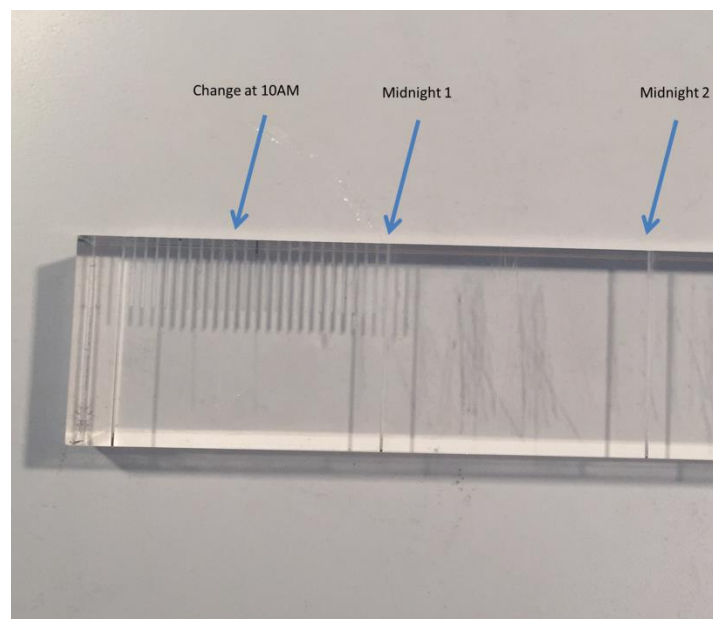
- Release the head of the spore trap by removing the pine.
- Fill the form for the drum changes and tick the checking list (Excel file).
- Keep the carrying cases containing the drums in the refrigerator at 4 ° C until you cut the tapes.

8.1.6. How to cut the tapes and place fragment in Eppendorf

- Prepare 2ml safelock cap from Thermo scientific (or other similar tubes with safelock) fill with around 200 mg of Ballotini balls (8.5 grade, 400-455µm diameter, or similar balls), then sterilise it in an autoclave.
- Work under a laminar cabinet or a sterile room
- Place the drum on the drum holder and cut the 2 sides adhesive tapes at the green dash.
- On the cutting board, align the start of the exposure with the correct hour (photo below). 1 bar corresponding to 1 hour.

Tips: The start of the exposed tapes may not be exactly at the edge of the tape, it may be 1 mm over. Look at where the exposure starts, you should see a difference (dust and particles on it) Just after the drum change, you can mark the start time with a needle in the orifice and use the mark as a guide

- Cut at midnight for day one (only a partial day, example picture 6, 10am → midnight 1) and then at every subsequent 24 hrs (line of the guide, example picture 6, midnight 1 → midnight 2). There are grooves on the cutting board. Use a very fine scalpel. The last slide will only be a partial day as well.



Picture 28

- Transfer each segments carefully in a sterile 2ml safelock cap previously named (see later). Be careful to take the fragment of Melinex by the edge (not exposed), use a fine forceps for this. You must wind up the fragment of tapes with the exposed side of the tapes inward. It is not easy to make, so I suggest you to train yourself a little in advance. The objective is to place the fragment inside the 2ml safelock cap with almost no overlap of the exposed surface of tapes
- The last fragment coming from a given drum should be placed in the same 2ml safelock cap than the first fragment of tape of the next drum in order to have a full midnight to midnight sample.
- You should have a total of $91 \times 2 = 182$ sample by country / year

- Write on the top of the 2ml safelock cap **the number of the sample** (example 1-91), on the side of the 2ml safelock cap **write the full ID of the sample** : Initial of the country // date // spore trap letter (example : BE170901a), see my attached Excell file
- Place the 2ml safelock cap in a box into the refrigerator minus 20°C until you send the whole collection to me.

8.2. Mise au point d'une méthode de quantification en temps réel de deux mutations importantes dans les résistances aux triazoles (S524T) et aux SDHI (H152R) chez la septoriose : étude de cas européens

Multiplex qPCR assay for simultaneous quantification of CYP51-S524T and SdhC-H152R substitutions in European populations of *Zymoseptoria tritici*

Hellin P.^{1,2}, Duvivier M.¹, Clinckemaillie A.¹, Bataille C.¹, Legrève A.², Heick T.M.³, Jørgensen L.N.³, Andersson B.⁴, Samils B.⁴, Rodemann B.⁵, Berg G.⁶, Kildea S.⁷

¹Plant and Forest Health Unit, Walloon Agricultural Research Center, Rue du Bordia 11, 5030 Gembloux, Belgium

²Applied Microbiology, Earth and Life Institute, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2 box L7.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

³Department of Agroecology, Aarhus University, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse, Denmark

⁴Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, PO Box 7026, SE-750 07 Uppsala, Sweden

⁵Department of Mycology and Virology, Julius Kühn-Institut, Messeweg 11/12, D-38104, Braunschweig, Germany

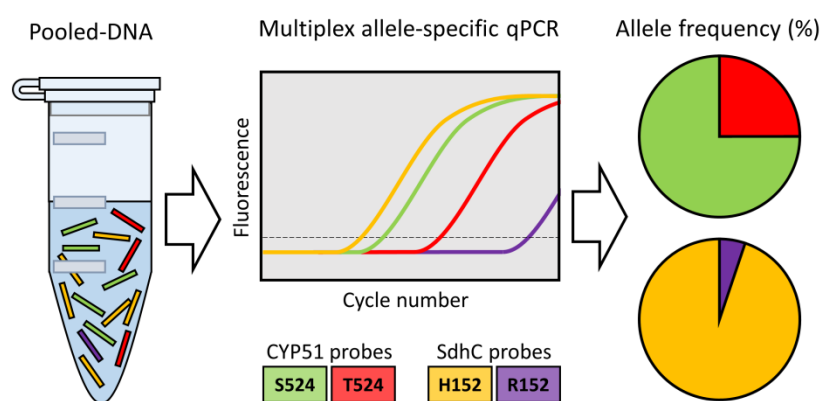
⁶Plant Protection Centre, Swedish Board of Agriculture, Box 12, Alnarp, SE 230 53, Sweden

⁷TEAGASC, The Agriculture and Food Development Authority, Oak Park, Carlow, Ireland

8.2.1. Abstract

Demethylation inhibitor (DMI) and succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides are currently relied upon for the control septoria tritici blotch (STB) in European wheat fields. However, multiple mutations have occurred over time in the genes encoding the targeted proteins which have led to a practical loss of fungicide efficacies. Among the different amino acid substitutions in *Zymoseptoria tritici* associated with resistance to these fungicides, S524T in CYP51 (DMI target) and H152R in SdhC (SDHI target) are regarded as conferring the highest resistance factors to DMI and SDHI, respectively. To facilitate further studies on the monitoring and selection of these substitutions in *Z. tritici* populations, a multiplex allele-specific qPCR assay allowing for estimation of both allele frequencies in bulk DNA matrices was developed. The assay was then used on complex DNA samples originating from a spore trap network set up in Belgium, Denmark, Sweden and Ireland in 2017 and 2018 as well as on symptomatic leaf samples. The S524T allele was present in all field samples and its proportion was significantly higher in Ireland than in Belgium, whereas the proportion of H152R was only sporadically present in both countries. The frequency of S524T was highly contrasted in the airborne inoculum of all four countries, however, the H152R allele was never detected in the airborne inoculum. The method developed in this study can be readily adopted by other laboratories and used for multiple applications including resistance monitoring in field populations of *Z. tritici*.

8.2.2. Graphical abstract



8.2.3. Introduction

Septoria tritici blotch (STB) is a devastating wheat disease caused by the fungal agent *Zymoseptoria tritici*. Despite recent advances in the selection and commercialization of more resistant cultivars, this disease remains endemic and problematic in Europe due to the high evolution capacity of *Z. tritici* that allows the species to circumvent cultivar resistance (Cowger *et al.*, 2000; O'Driscoll *et al.*, 2014). As such, fungicides are heavily relied upon to provide control of the disease. Amongst these, demethylation inhibitors (DMIs), predominantly azoles, and succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs) are commonly applied. However, similar to cultivar resistance, fungicide control also suffers from the rapid adaptation of the pathogen to its environment (Dooley *et al.*, 2016; Leroux and Walker, 2011; Torriani *et al.*, 2009).

Although DMIs were first introduced to the cereal market in the 1970's (Lewis *et al.*, 2016; Russell, 2005), molecules such as tebuconazole (mid-80's), epoxiconazole (mid-90's) and prothioconazole (early 2000) are still heavily relied on for disease control in winter wheat. Unfortunately in recent years, they have gradually lost their field efficacy against STB. Several fungicide resistance mechanisms are reported to contribute to this decline in effect against *Z. tritici* (Cools *et al.*, 2012; Cools and Fraaije, 2012; Kildea *et al.*, 2019; Leroux and Walker, 2011; Omrane *et al.*, 2015). Most notably, target-site resistance has caused progressive shifts in the sensitivities in *Z. tritici* populations to varying degrees depending on the molecule. These shifts have resulted from the continual genetic recombination and selection that have occurred in *Z. tritici* during this period, with more than 30 amino acid substitutions in the CYP51 protein now reported (Cools and Fraaije, 2012; Garnault *et al.*, 2019; Huf *et al.*, 2018; Leroux *et al.*, 2007). Amongst these, S524T is one of the most recent alteration in CYP51 (Cools *et al.*, 2011) and occurs at different frequencies throughout western Europe (Jørgensen *et al.*, 2018). This substitution has always been reported in combination with other substitutions, and can occur with additional resistance mechanisms such as targetsite overexpression and fungicide efflux (Kildea *et al.*, 2019; Leroux and Walker, 2011). Nonetheless S524T is increasingly associated with higher levels of resistance level to all azoles (Cools *et al.*, 2011; Kildea *et al.*, 2019).

The SDHIs are the most recent group of fungicides to have been introduced for the control of wheat diseases. While fungicides belonging to the SDHIs have been available since the 1960s, their use in cereals has been limited. However, since the mid-2000, starting with the introduction of boscalid, the SDHIs have become an integral component of disease control in cereals (Lewis *et al.*, 2016). As with the azoles, their increased usage has been accompanied by the selection of resistance in *Z. tritici* populations. Numerous key alterations have in recent years been reported in the different sub-units of the succinate dehydrogenase (Sdh) enzyme (FRAC, 2020). Amongst these the H152R substitution in the SdhC subunit was been identified as by *in vitro* evolutionary studies as causing resistance to all the major SDHIs (Scalliet *et al.*, 2012). It was first detected in the field in Ireland in 2015 (Dooley *et al.*, 2016). At first, this substitution was present at relatively low frequencies and seemed to be restricted to Ireland and the UK but it has recently occurred sporadically in continental Europe including Northern France, Germany and the Netherlands (FRAC, 2020).

The ability of *Z. tritici* to develop fungicide resistance relies partially on its heterothallic lifecycle allowing inter-individual recombination, its host specificity and relatively short latent period, each of which have been described by Grimmer *et al.* (2015) as important factors in the risk of resistance developing. Furthermore it is during epidemic outbreaks, when most of the fungicide selection occurs, that *Z. tritici* increases its population size by the rapid production of splash-dispersed asexual pycnidiospores. Naturally occurring mutants, showing new adaptive traits, have therefore a higher probability of emerging (Stukenbrock *et al.*, 2011). The proportions of these can rapidly increase in local populations if the developed trait

confers advantages over the wider population (McDonald and Mundt, 2016). Sexual reproduction also plays a key role in the adaptive potential of *Z. tritici*, allowing for new combinations of alleles to be created (Brunner *et al.*, 2008). Windborne ascospores, produced following sexual reproduction, can be detected throughout the growing season in western Europe (Duvivier *et al.*, 2013; Hunter *et al.*, 1999). They are likely to be the primary inoculum source and initiators of STB epidemics but also likely to contribute to epidemic progression during the season. Moreover, the high mobility of ascospores (Duvivier *et al.*, 2013) induces a continuous intermingling of pathogen populations on a large scale (Linde *et al.*, 2002).

Molecular quantitative methods are often used in fungicide resistance monitoring to replace or complement traditional microbiological methods requiring isolation and characterization of a multitude of individuals. Molecular techniques allow for the quantification of specific mutations in bulk-DNA samples and are therefore much less time-consuming. Different molecular tools have been implemented over the years, including various type of allele-specific qPCR assays based on probes or SYBR Green (Billard *et al.*, 2012; Fraaije *et al.*, 2005; Fraaije *et al.*, 2007; Selim, 2009; Stammler and Semar, 2011; Taher *et al.*, 2014), as well as pyrosequencing (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2017; Phelan *et al.*, 2017; Stammler *et al.*, 2008) and more modern Illumina-based sequencing (Pieczul and Wąsowska, 2017). Each of the above assays has both advantages and disadvantages. Nevertheless, unlike the sequencing-based platforms which often require expensive infrastructure, qPCR based assays have a significant advantage in they are easier to implement in most laboratories for both routine uses, and for tests that requires a quick turnaround. Moreover, qPCR offers a low limit of detection, useful in the early detection of extremely rare mutations. The specificity of an allele-specific qPCR assay relies either on primer (Selim, 2009), probe (Fraaije *et al.*, 2005; Fraaije *et al.*, 2007) or even both (Billard *et al.*, 2012) that span the target nucleotide polymorphism, with probe-based assays being generally more specific. Modification of the probes, whether using locked nucleic acid (LNA) bases or minor groove binder (MGB) conjugates, increase the melting temperature of the probe. This permits a shortening of the probe length, thus increasing its specificity to the target sequence and allowing for discrimination based on single-nucleotide polymorphisms (SNP). By combining multiple specific probes with different fluorophores, it is possible to accurately quantify the frequency of different SNPs in bulk DNA samples. For example, the use of a real-time PCR assay to quantify the proportion of the G143A substitution, conferring Quinone outside Inhibitor (QoI) resistance in *Z. tritici*, revealed that QoI treatments rapidly increased the proportion of the allele in airborne ascospores trapped in the wheat fields (Fraaije *et al.*, 2005). Although MGB and LNA-based qPCR assays show similar performance (Letertre *et al.*, 2003), the design of LNA probes is more flexible by offering the choice of the positions and number of LNA bases in the probes.

In the current study, a specific and sensitive qPCR method that uses double-dye LNA probes was developed to allow for the simultaneous detection and quantification of the CYP51-S524T and the SdhC-H152R in *Z. tritici* in a single reaction. The applicability of the developed assay to quantify these key substitutions involved in fungicide resistance in pooled-DNA extracts from air and leaf samples originating from European countries with contrasting resistance situations is demonstrated and discussed.

8.2.4. Material and Methods

Fungal strains and DNA extraction

A collection of *Z. tritici* isolates (Table 1) from phytopathological collections held by both Teagasc and CRA-W were used to validate the qPCR assays. Strains M34 and OP15.13 (previously described by Dooley *et al.*, 2016) were used as reference strains because they were known to have the substitution S524T (CYP51) and H152R (SdhC), respectively. All strains were kept at -80°C in 30% glycerol and cultivated on potato dextrose agar in the dark (20°C) for 4-7 days before use. DNA was extracted from yeasty spores using the EZNA Plant DNA Kit (Omega Bio-tek) following the manufacturer's instruction.

Probes and primers design

To specifically detect the frequency of S524T and H152R in bulk DNA samples, a series of two primers and 2 double-dye LNA probes were designed individually for each. For each locus, a primer pair targets and amplifies the targeted region encompassing the SNP, and two probes specifically bind to either one of the possible wild-type or mutated alleles (Table 2). Probes and primers were designed based on the wild-type sequence of each protein encoding gene of the IPO323 sensitive strain of *Z. tritici* (www.fungi.ensembl.org/Zymoseptoria_tritici) as well as from sequence containing the S524T substitution in CYP51 (GenBank MT345793) and the H152R substitution in SdhC (Genbank MT345792). First, the probe sequences were manually tailored (varying nucleotide size and number/position of LNA bases) to obtain probes with high affinity to their specific target (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) as well as with high instability in regards to non-targeted DNA sequences to ensure mismatch discrimination (You *et al.*, 2006). Primers were subsequently obtained to produce a 100-200 bp fragment surrounding the probe sequence using the Primer3 webtool (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) ensuring computability with the predesigned probes. The wider primers and probes specificity was verified on GenBank using primer-Blast (Ye *et al.*, 2012). The final sizes of the PCR products were 133 bp and 111 bp for S524T and H152R assays, respectively. The compatibility of all designed oligonucleotides to work in a single reaction was evaluated using the multiple primer analyzer webtool (www.thermofisher.com).

qPCR assay optimization and performance

Standard PCR was performed using the two sets of primers on M34 and OP15-13 to produce amplicons representative of each of the target loci (S524 & T524; H152 & R152) using GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase kit (Promega). Fragments were visualized on an agarose gel stained with ethidium bromide to confirm specificity. PCR products were subsequently purified using a SmartPure PCR kit (Eurogentec) and DNA concentration and purity were assessed using a Nanodrop spectrophotometer (Thermofisher Scientific). For each qPCR reaction, the corresponding PCR amplicon was used as a template to determine the best primer (100, 300 or 500 nM) and probe (150 and 250 nM) concentrations. The final concentrations of primers and probes in the reaction were 100 nM and 250 nM, respectively. qPCR reactions were performed in a total volume of 20 µL containing 2 µL of template DNA, using Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) on a CFX96 thermocycler (BioRad). The cycling protocol consisted of an activation step at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 3 s) and annealing/extension (62°C for 45 s), with the intensity of fluorescence captured at the end of every cycle.

Table 1. Cycle threshold values (CT) obtained for each probe of the allele-specific qPCR assay using DNA from *Z. tritici* strains of the different genotypes.

Country	Year	Strain	Targeted genotype ^a	qPCR Cycle threshold (CT) ^b			
				S524	R524	H152	R152
-	-	MUCL 45772	WT	28.2	- ^c	30	-
-	-	CBS 392.59	WT	28.4	-	29.6	-
Belgium	2008	39/08	WT	23.8	-	25.5	-
Belgium	2016	16PE4	WT	25	-	26.5	-
Belgium	2018	31X1-1	WT	21.7	-	25	-
Belgium	2019	BIX10-1	WT	23	-	23.9	-
Belgium	2019	BIX6-1	WT	23.6	-	24.5	-
Belgium	2019	BIX20	WT	23.7	-	24.6	-
Belgium	2019	PID6	WT	26.2	-	27	-
Belgium	2019	BIX5	WT	26.7	-	27.3	-
France	2009	09-A5A12a	WT	20.1	-	21.3	-
France	2009	09-ASA3	WT	25	-	25.1	-
Ireland	2015	KB2	WT	24.2	-	25.7	-
Ireland	2015	C1	WT	25.3	-	26.7	-
Ireland	2015	M19	WT	25.4	-	27	-
Ireland	2015	C3	WT	25.5	-	26.9	-
Netherlands	-	IPO-323	WT	23.3	-	24.8	-
Belgium	2019	PID22	S524T	-	24.1	25.7	-
Belgium	2019	PID7-1	S524T	-	22.5	23.9	-
Belgium	2019	PID7-2	S524T	-	22.1	23.6	-
Belgium	2019	BIX10-2	S524T	-	23.2	24.9	-
Belgium	2019	BIX10-3	S524T	-	23.3	24.9	-
Ireland	2015	M12	S524T	-	25.5	26.3	-
Ireland	2015	KB18	S524T	-	25.3	26.1	-
Ireland	2015	KB32	S524T	-	25	25.7	-
Ireland	2015	C11	S524T	-	26.2	27.4	-
Ireland	2015	KB32	S524T	-	27.1	27.8	-
Ireland	2015	M33	S524T	-	25.4	26.3	-
Ireland	2015	C12	S524T	-	27.5	28.2	-
Belgium	2019	BIX6-2	H152R	25.3	-	-	25.9
France	2018	1473	H152R	22	-	-	23
France	2018	1466	H152R	24.6	-	-	25.1
Ireland	2015	OP15-13	H152R	25.3	-	-	26.1
Belgium	2018	WL	S524T + H152R	-	21.5	-	23.5
Belgium	2018	VJ-1	S524T + H152R	-	21.6	-	23
Belgium	2019	BIX3	S524T + H152R	-	23.9	-	25.1
Belgium	2019	BIX25	S524T + H152R	-	21.9	-	23.1
Belgium	2019	PID1	S524T + H152R	-	23.5	-	24.8
France	2018	1450	S524T + H152R	-	25.6	-	26.4
Ireland	2018	S18-158	S524T + H152R	-	19.2	-	19.3
Ireland	2018	S18-165	S524T + H152R	-	19	-	19.4

^a Genotype at the amino acid positions 524 (CYP51) and 152 (SdhC), previously determined using Sanger sequencing.

^b Mean cycle threshold values obtained with each probe in a multiplex assay. DNA concentrations of the different samples were not normalized.

^c No fluorescent signal detected

Table 2. Specifications of the oligonucleotides designed for the specific quantification of allele

Assay	Oligo name	Sequence ^a	5'/3' modification	T _m (°C)
S524T (CYP51)	<i>Probes</i>			
	Cyp524S-probe	TTTGTTC <u>AG</u> CCGGCC	FAM / BHQ-1	57.8
	Cyp524T-probe	TTTGTTC <u>AC</u> CCGGCC	HEX / BHQ-1	56.9
	<i>Primers</i>			
	CYP524-F	GGTGGGTACGGATTACAG	-	52.1
	CYP524-R3	CCACCTATGGTTCTGCATAC	-	52.8
H152R (Sdh-C)	<i>Probes</i>			
	SdhC152H-probe	ACCAAAT <u>GC</u> CTCACT	Cy5 / BHQ-2	58.3
	SdhC152R-probe	ACCAA <u>AC</u> GCCTCACT	Texas Red / BHQ-2	57.7
	<i>Primers</i>			
	SdhC152-F	GTGACGTTTCATTCGTTGA	-	50.7
	SdhC152-R	AACACTCAACCCCAACAAC	-	52.8

a the positions of LNA bases in the oligonucleotide sequence are indicated by underlined bases. The nucleotides related to the amino acid change leading to a resistant phenotype are indicated in bold.

b Melting temperatures are only indicative and were obtained using the IDT OligoAnalyzer webtool with default parameters.

The efficiency and sensitivity of each reaction were tested using serial ten-fold dilutions of PCR amplicons going from 500,000 to 5 DNA copies of each amplicon. Reactions were performed twice with two technical replicates. Cycle threshold (CT) values were determined above a baseline threshold of 100 relative fluorescence units (RFU). The qPCR assays were then evaluated for use as a single multiplex assay, with each primer and probe at the previously determined concentrations. The four PCR amplicons were used as templates, mixed together in the same ten-fold serial dilution to produce a standard curve for each of the four alleles. The reaction was performed four times with two technical replicates. The specificity of the multiplex assay was tested against DNA from *Z. tritici* strains of known genotypes (Table 1). The specificity was also tested against wheat DNA as well as against DNA from various fungal species found in and around wheat fields including: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *Microdochium nivale*, *M. bolleyi*, *Oculimacula acuformis*, *O. yallundae*, *Trichoderma koningii*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria alternate*, *A. solani*, *Acremonium strictum*, *Helminthosporium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Venturia inequalis*, *Cercospora beticola*, *Botrytis cinerea*, *Blumeria graminis*, *Puccinia striiformis* and *P. triticina*.

To test the validity of the method for allele frequency determination in unknown pooled-DNA samples (such as aerosol and leaf samples), a calibration curve was made using a series of artificial samples consisting of PCR amplicons mixtures of the 4 alleles varying in frequency (from 95 to 5% for a total 10,000 amplicons). The test was performed twice in duplicate wells using the multiplex assay with mixtures of the four amplicons as templates. To improve repeatability, reduce inter-plate variation and calculate PCR efficiency in routine experiments, plasmids containing the amplicon sequences were used to produce standard curves in every qPCR run. DNA fragments identical to the amplicon sequences were *de novo* synthesized and cloned into pEX-A128 vector by Eurofins Scientific (Germany).

Wheat leaf sample collection and DNA extraction

In 2018, wheat leaf samples with distinctive STB symptoms were collected towards the end of the growing season in commercial crops in Belgium (N=6) and Ireland (N=7). Diseased leaves were selected randomly every meter along a W-shaped walk across the fields. Some of these fields were chosen based on the performance of fungicide programs and the perceived likelihood of azole and SDHI resistance in the *Z. tritici* population. All leaves were air-dried for 5 days and subsequently stored at -20°C. One STB lesion per leaf was cored using a 5 mm hole puncher. Leaf plugs of the same field were grouped together at random in 2 mL screw-cap tubes (10 cores per tube), with four tubes per field. The cores were freeze-dried within the tubes and ground with a 5 mm glass bead using a FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals) for 1.5 min at 6 m s⁻¹. DNA was extracted from each tube using the peqGOLD Plant DNA mini kit (VWR), with slight modification in the lysis protocol as follows. After adding 400 µL of PL1 buffer to the plant material, samples were homogenized again for 40 s at 6 m s⁻¹ and were left for a 10 min rest on ice before adding the RNase. The rest of the procedure followed the manufacturer's instructions. DNA quantity and purity of the extracts were checked using a spectrophotometer (NanoDrop One, Thermofisher Scientific). Serial dilutions were made from some leaf DNA extracts with different mutation frequency profiles. The presence of both S524T and H152R in each DNA solution was determined using the multiplex qPCR. Allele frequency data were always first arcsine square-root transformed before statistical comparisons of the mean using ANOVA. Allele frequencies calculated from qPCR performed on those samples were stable up to at least a 1000-fold dilution ($P = 0.94$ and 0.53 for S524T and H152R, respectively; Table S1). The DNA quantity from subsequent leaf samples was therefore not adjusted.

Spore trapping and DNA extraction of air samples

Air was sampled in wheat fields located in Belgium, Denmark, Sweden and Ireland using Burkard 7-day recording volumetric spore traps (Burkard Manufacturing Co. Ltd). In each country, sampling was performed in two fields in 2017 and 2018, except in Ireland, where sampling only took place in 2017 in three fields. In 2018, both Danish fields were located in Flakkebjerg at a distance of 100 m. Flakkebjerg 1 was placed on grass area out site the fields and Flakkebjerg 2 placed right next to a wheat field. Air sampling was made during a three months period starting from the 1st of September to the 30th of November, reflective of airborne inoculum that initiated infections in surrounding newly emerged wheat crops during these seasons. The airborne inoculum was collected on a vaseline-coated Melinex tape and total *Z. tritici* DNA from daily tape fragments was extracted and quantified as described by Duvivier *et al.* (2013) with minor modifications to the probe sequence (TGTGGGACACGACTCGCGGC). The number of *Z. tritici* DNA copy trapped daily were transformed to ascospores m⁻³ day⁻³, considering that two copies were present in each ascospore (2-cell spore) and the daily air intake of the sampler of 14.4 m³ day⁻¹. Air samples containing at least the DNA equivalent of 300 ascospores m⁻³ day⁻³ were further investigated for the occurrence and frequency of both the S524T and H152R alleles using the multiplex qPCR.

8.2.5. Results

Performance of the allele-specific qPCR assay

In each probe, LNA bases were included as doublet or triplet centred around the targeted SNP, except for the SdhC152H probe in which an extra LNA base was added to ensure sufficient T_m of the probe. The developed sets of primers and probes were first tested independently on serial ten-fold dilutions of their respective target amplicon (from 250,000 to 2.5 DNA copies μL^{-1}). For all four reactions, high linearity of response signals was observed over the range of DNA concentrations tested (Figure S1). Similar results were obtained thereafter, when all sets of primers and probes were used in a multiplex assay (Figure 1), with a limit of detection estimated at 2.5 DNA copies μL^{-1} . The calculation of allele frequency was made by comparing the quantity of the resistant allele copies to the total quantity of alleles at the same locus, following the relationship between C_T values and DNA copy number. The estimated allele frequencies for both S524T and H152R were not significantly different between the serial dilution of amplicon presented in Figure 1 ($P = 0.215$ and 0.927 for S524T and H152R, respectively) suggesting that the assay gives consistent results regardless of the total quantity of *Z. tritici* DNA in bulk samples.

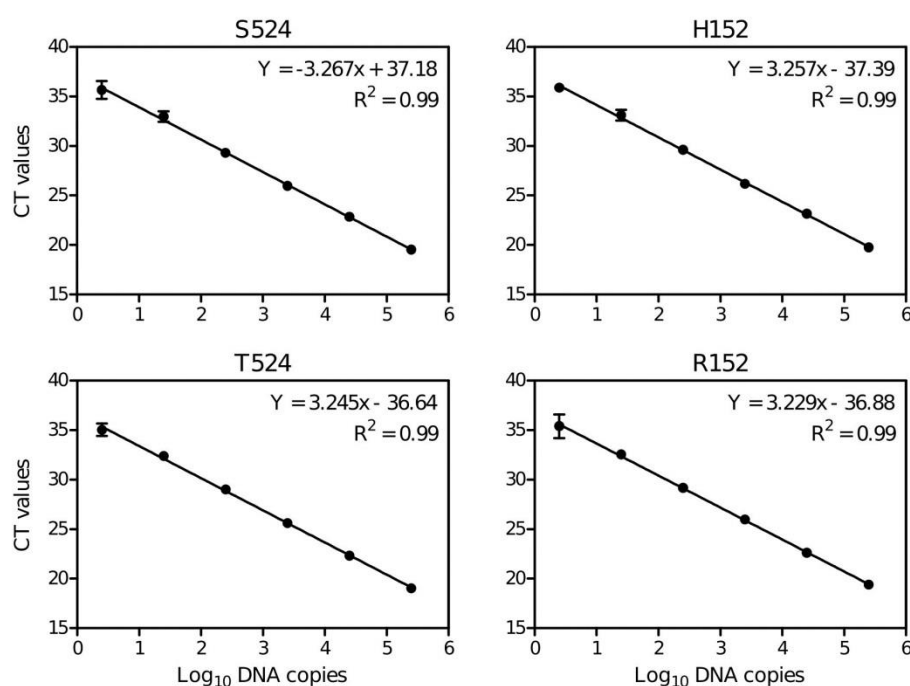


Figure 1. Linear regression between the log-transformed concentrations of PCR amplicons and the cycle threshold (C_T) values for each allele. The four PCR amplicons were used as templates, mixed together in the same 10-fold serial dilution to produce a standard curve for each of the four alleles. Error bars represent the standard deviation of C_T values for four independent quantitative PCR runs performed in multiplex reactions.

However, the estimated allele frequencies are more variable at lower total DNA concentrations. Allele frequencies were also estimated in samples made of different proportions of the four amplicons. The measured allele frequencies closely followed the

expected frequencies of alleles in the amplicon mixture samples (Figure 2), indicating that the assay could be used for accurate estimation of allele frequencies in pooled-DNA samples. However, for H152R a slight difference was notable between measured and theoretical values at lower H152R amplicon frequencies. This could result in the under-estimation of the abundance of this allele when present at low frequency in samples (up to an actual difference of around 5%). The multiplex assay was highly specific to *Z. tritici* DNA. Moreover, when DNA from 41 strains of *Z. tritici* were tested, the results showed a perfect match with the genetic data from Sanger sequencing and no non-specific amplification was observed (Table 1).

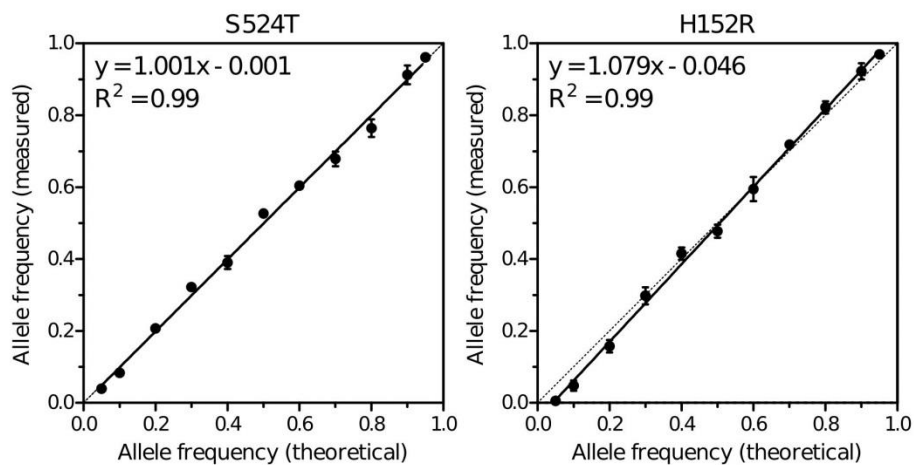


Figure 2. Concordance between the frequencies of S524T and H152R alleles measured with the quantitative PCR (qPCR) assay (measured) in artificial samples of DNA made with known allele frequency (theoretical). The dashed lines correspond to the bisector (perfect match). Error bars represent the SD obtained with four reactions performed over two independent qPCR runs.

Allele frequencies in wheat leaves

All four alleles were detected in the leaf sample originating from Belgium and Ireland at different levels (Figure 3). The S524T allele was detected in all sub-samples and ranged from 0.25 to 100 %. It's frequency was significantly higher in Ireland than in Belgium (mean = 83.5% and 26.8%, respectively; $P < 0.001$). In each country, differences in S524T frequency were also detected between locations ($P < 0.001$ in Belgium and $P = 0.039$ in Ireland). The presence of H152R was more sporadic (Figure 3). It was detected only in samples originating from three of the Belgian fields (Milmort, Sauvenière and Xhendremael) and five of the Irish fields (Cork, Meath, Oak Park, and Wexford A and C). Where detected, the frequency of the H152R allele was extremely low with the smallest frequency in sub-samples evaluated at 0.003%. However, in Meath the mean frequency of H152R reached almost 15%, with one of the sub-samples containing as much as 30% of this substitution. On average, similarly low levels of H152R were observed in Belgium and Ireland (mean = 0.7% and 1.9%, respectively; $P = 0.663$). Slight differences could be statistically detected amongst fields in Belgium ($P = 0.047$), but not in Ireland ($P > 0.12$).

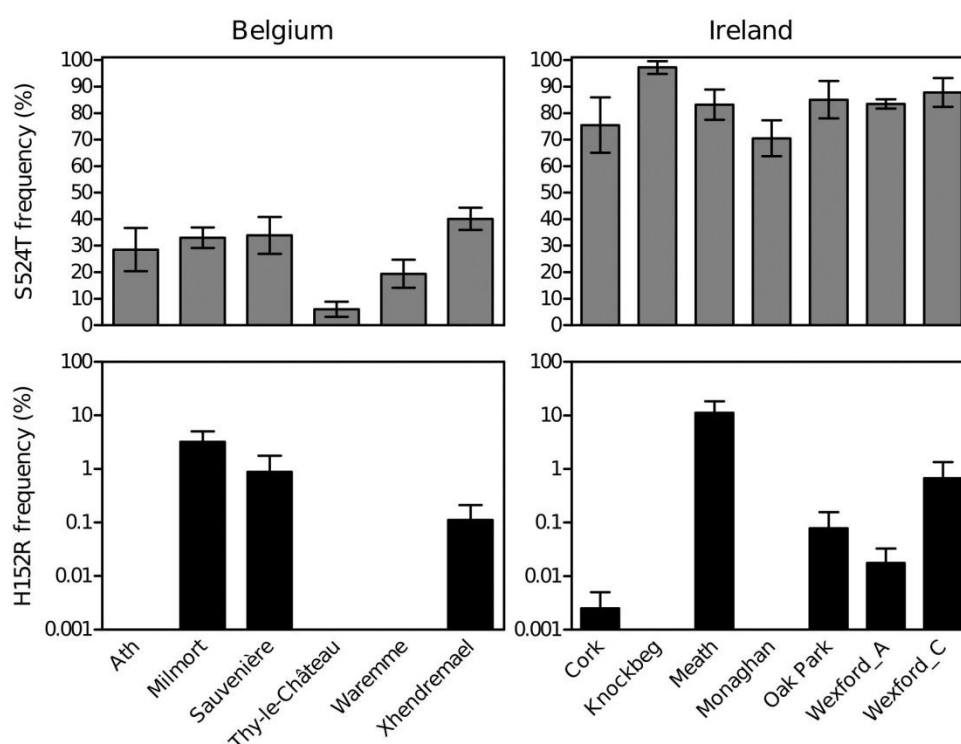


Figure 3. Frequencies (%) of the S524T and H152R alleles in leaf samples originating from Belgian and Irish commercial wheat fields sampled in July 2018. H152R frequencies were plotted against a log-scale axis to allow the observation of low-frequency data. Error bars represent the standard error between the mean frequencies obtained from pooled leaf sample of each field. Four samples from each field were analyzed except in Cork and Wexford_C ($n = 2$).

Alleles frequencies in air samples

Airborne inoculum of *Z. tritici* was detected in all the fields sampled, with percentages of days with an inoculum detection varying from 39% up to 91% during the survey period (Table 3). The mean quantity of ascospores trapped varied greatly between fields with more than 10,000 ascospores m^{-3} detected in Lönstorp (Sweden) in 2017 (Table 3; Figure S2). Different levels of ascospores were detected between the two seasons, however this depended on the country (Figure S2). For example, in Belgium, inoculum levels were higher in 2018 than in 2017, whereas it was the opposite in Sweden. The two traps from Flakkebjerg (Denemark) in 2018, placed with a distance of 100 m from each other, also showed major differences in the number of ascospores per day (Table 3; Figure S2) with higher levels of inoculum in the spore trap sitting next to the wheat field. Nevertheless, inoculum detection was similar in both spore traps.

Table 3. Overview of the total *Z. tritici* inoculum detection and S524T alleles frequency obtained in the European spore-trap network from 1 September 1st to 30 November 30th in 2017 and 2018.

Country	Year	Site	Ascospores ^a				Frequency of S524T		
			Data ^b	Detection	Mean	Maximum	Data ^c	Mean	Maximum
			n	%	m ⁻³ day ⁻¹	m ⁻³ day ⁻¹	n	%	%
Belgium	2017	Thy-le-Château	91	62.6	45.8	361.6	0	-	-
		Voroux-Goreux	90	44.4	61.3	1076.5	1	0.0	0.0
	2018	Thy-le-Château	90	76.7	262.3	3762.2	14	23.1	62.9
		Voroux-Goreux	91	60.4	76.9	825.7	3	50.1	100.0
		Total	362	61.0	111.3		18	26.3	
Denmark	2017	Flakkebjerg	89	76.4	154.8	1402.2	13	12.4	42.0
		Horsens	38	18.4	11.1	162.6	0	-	-
	2018	Flakkebjerg 1	90	72.2	152.1	1319.7	9	2.8	10.0
		Flakkebjerg 2	90	88.9	843.5	4547.4	35	8.0	60.2
		Total	307	64.0	338.1		57	8.2	
Ireland	2017	Grange	91	91.2	236.1	1423.5	6	28.3	40.0
		Gurteen	79	64.6	81.3	1452.0	3	46.3	100.0
		Oak Park	28	78.6	91.2	415.0	2	31.0	38.2
		Total	198	78.1	153.8		11	33.7	
Sweden	2017	Lönnstorp	85	68.2	501.6	10528.1	15	12.2	31.7
		Sandby Gård	84	84.5	778.8	8424.9	42	12.3	30.5
	2018	Lönnstorp	41	39.0	9.5	80.9	0	-	-
		Sandby Gård	81	76.5	115.1	3394.8	2	44.5	77.5
		Total	291	67.1	404.7		59	13.3	

^a The number of ascospores m⁻³ day⁻³ were estimated on the basis of the number of DNA copies measured by qPCR, considering that two copies were present in each ascospore (2-cell spore) and the daily air intake of the sampler of 14.4 m³ day⁻¹.

^b Number of days for which air samples were collected

^c Number of air samples, with a *Z. tritici* content higher than ascospores m⁻³ day⁻³, for which an estimation of the proportion of S524T mutation could be accurately made

A total of 209 samples were screened with the newly developed qPCR assay to quantify the proportion of S524T and H152R substitutions. Allele frequencies in airborne inoculum could be determined from all sampled fields except in Lönnstorp (Sweden) in 2018, where the daily *Z. tritici* DNA amounts were not sufficient. Overall for about 30% of these samples, the fluorescence signals were not interpretable (i.e. low, inconsistent or absence of signal) even after being retested. H152R was not detected in any of the tested samples. On the other hand, the S524T substitution was commonly found and the qPCR assay allowed us to monitor its temporal dynamics in the air samples. Differences in the frequencies of S524T were observed between fields, ranging from 0 to 100% (Table 3). The number of samples with interpretable results also varied greatly between fields and was comprised between 1 to 42 and a weighted mean was therefore computed for each country. Overall, a higher frequency of S524T was found in Ireland, where an estimated one-third of the ascospores detected had the S524T substitution. The frequency of S524T was evaluated at 26.3% in Belgium, which was more than twice that observed in Sweden (13.3%), whilst in Denmark, only 8.2% of the airborne spores carried the S524T substitution. At the individual field scale, large changes in the frequency of S524T could sometimes be observed from one day to the next, with evident temporal trends visible during the surveyed period (example in Sandby Gård, SE in 2017; Figure 4). Moreover, the frequency of the S524T allele (arcsine square-root transformed) in the whole dataset was not related to the *Z. tritici* airborne load (log-transformed; $P = 0.26$ with a null slope).

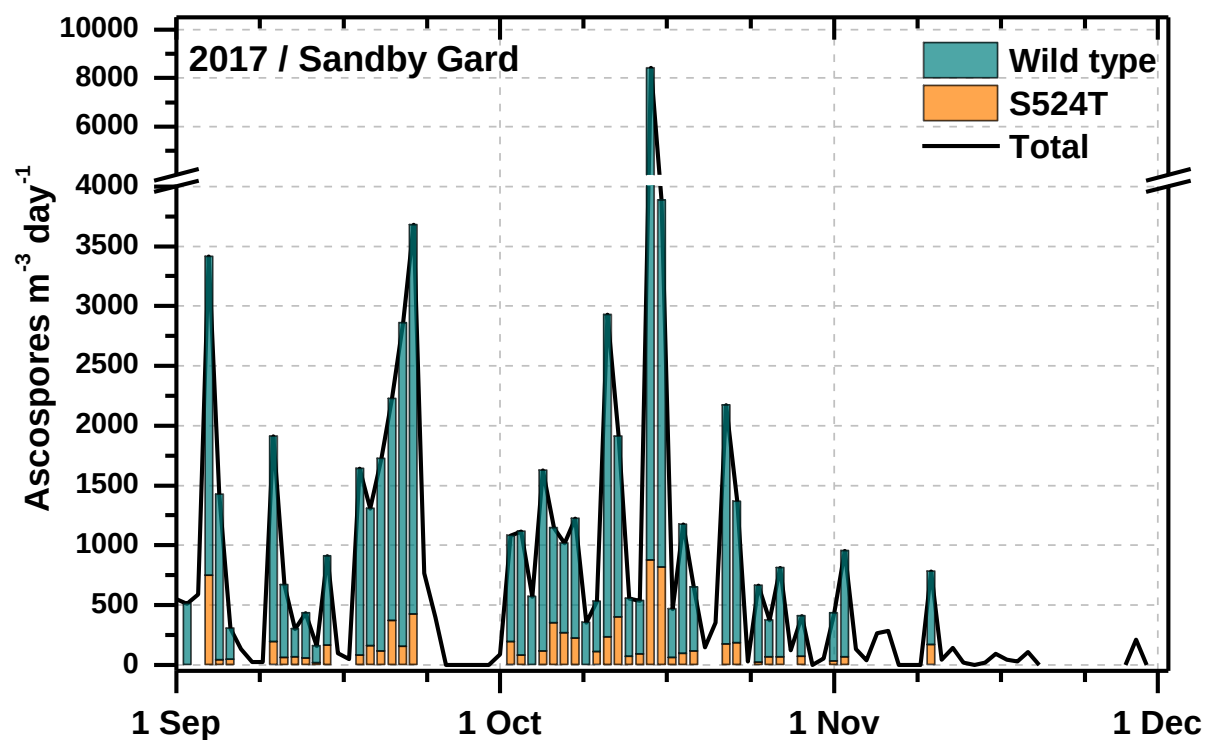


Figure 4. Daily distribution of airborne *Zymoseptoria tritici* inoculum (ascospores $\text{m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) in a wheat field located in Sandby Gård (Sweden) from 1 September to 30 November 2017. Stacked bars represent the proportion of S524T alleles in the total *Z. tritici* ascospores trapped during that day.

8.2.6. Discussion

As the azole and SDHI fungicides are heavily relied upon for the control of STB in European wheat crops, ensuring the continued effectiveness of both chemistries is essential to maintain the profitability of wheat production. The key to achieving this will be our ability to delay the emergence and subsequent spread of fungicide resistance through the careful implementation of anti-resistance measures (van den Bosch *et al.*, 2014). The success of such strategies will in part result from our capacity to devise, evaluate and deploy such strategies, and fundamental to this is the need to accurately measure fungicide resistance. Although multiple CYP51 and SdhC alterations have been reported and their respective impacts on azole and SDHI sensitivity have been described (Dooley *et al.*, 2016; Huf *et al.*, 2018; Leroux and Walker, 2011; Rehfus *et al.*, 2018), the overall aim of the present study was to develop a single assay that allowed the detection and quantification of substitutions that had the greatest potential to impact azole and SDHI sensitivity. Among the multiple CYP51 alterations known to be present in the European *Z. tritici* population, the S524T substitution is recognized as contributing most to the recent decline in the azole fungicides (Cools *et al.*, 2011). Regarding SDHI alterations, it is the H152R substitution that confers the highest resistance factor to *Z. tritici* (Dooley *et al.*, 2016; Rehfus *et al.*, 2018), although this substitution might be associated with a fitness penalty (Scalliet *et al.*, 2012).

Although different mechanisms of resistance or combinations of alterations may arise and contribute to both azole and SDHI resistance, as both S524T and H152R are currently likely to reflect contemporary levels of azole and SDHI resistance. A multiplex allele-specific qPCR assay was therefore developed to simultaneously quantify their frequency in *Z. tritici* populations. The limited number of LNA bases, centred around the targeted SNPs, was sufficient to ensure the performance of each probe. The assay proved to be both specific, using isolates of known genotypes, and sensitive, detecting as low as 2.5 copies μL^{-1} of each template in a single reaction. The estimation of allele frequency was highly accurate, although a slight underestimation of H152R presence was observed in samples containing a low frequency of this allele.

To test the robustness and applicability of the developed qPCR assay, a collection of samples (wheat leaves and air samples) likely to contain mixtures of all four alleles was constituted. Symptomatic leaves were collected in multiple wheat fields from Ireland and Belgium in 2018. The assay was able to quantify the presence of each allele with high sensitivity. As anticipated, the proportions of S524T were significantly lower in Belgium than in Ireland. Overall, the occurrence of this substitution appears to have increased in the *Z. tritici* populations of both countries since 2015 (Jørgensen *et al.*, 2018). While the high sensitivity of the assay may not necessarily be required for the detection of S524T in Western-European populations of *Z. tritici*, this allele has to date been largely confined to European populations and it will likely emerge elsewhere, whether through migration or *de novo* emergence as previously described by McDonald *et al.* (2019) for other CYP51 alterations. Therefore, in these regions, high sensitivity for early detection may be required. Conversely, even in Belgium and Irish field populations, H152R was detected at extremely low frequencies in leaf samples, the exception being a single field in Ireland, where it was detected at a frequency of more than 10% on average. It is worth noting that the H152R assay tends to slightly underestimate the frequency of this allele when its present in a sample at a low frequency. Strains carrying the H152R substitution were indeed isolated in some of the sampled Belgian and Irish fields (e.g. Milmort, Cork, Meath, and Wexford C; data not shown).

To validate the qPCR assay with airborne inoculum, a network of airborne samplers was established across Western-Europe in 2017 and 2018. The samplers were positioned in wheat grown regions, and in most instances adjacent to or in close proximity to wheat fields. As *Z. tritici* ascospores are widely accepted as the dominant source of primary inoculum in

Western-Europe (Scott *et al.*, 1988; Shaw and Royle, 1989), airborne inoculum for a three month period was sampled roughly around autumn planting and crop establishment. Across all regions, the initial inoculum of *Z. tritici*, measured by qPCR, was generally abundant. The levels of *Z. tritici* inoculum detected on most days were comparable to those detected by Duvivier *et al.* (2013) in Belgium. Daily inoculum quantities were variable between years and countries, although trends were visible among fields sampled in the same country. This temporal pattern of inoculum sampling was particularly visible in 2018 in Denmark, where samplers were only distant by 100 m. Although the magnitude of trapped daily inoculum observed was higher in the sampler placed in the wheat field, inoculum detection between the two samplers was similar as observed by Duvivier *et al.* (2013). The difference in inoculum level observed might be related to the wind blowing direction as well as the crop that they were set up into.

As observed in the airborne inoculum of the four studied countries, S524T is now widespread throughout Western-Europe. The frequency of this allele varies considerably between countries, reflecting differences in field efficacy of the main azoles epoxiconazole and prothioconazole, previously reported by Jørgensen *et al.* (2018). Indeed, the S524T allele frequency was higher in Ireland than Belgium, followed by Sweden and then Denmark. Whilst the mean frequency of S524T in the Belgian airborne inoculum was comparable to the mean frequency in the field samples, this was not the case in Ireland. For example, the Oak Park air samples had a considerably lower frequency of S524T than the Oak park leaf samples which were taken in close proximity to the spore trap (<1km). The inoculum from the other two Irish fields also had mean S524T frequencies lower than it would have been anticipated. In the case of Oak Park it might be because the Oak Park leaf samples were collected post fungicide treatment, which included multiple applications of azole and SDHI fungicides, which would have theoretically increased the frequency of S524T. However, the spore trap placed in Oak Park in 2017 was adjacent to stubbles of the 2017 wheat crop, which contained equally high levels of S524T in the leaf samples (unpublished) as the samples collected in Oak Park the following year (this study). The airborne inoculum was captured during a period of the year when foliar fungicides are not applied, and equally the ascospores captured are also likely a dilution of those produced over a wider area than a single field. More surprisingly, the frequency of S524T fluctuated considerably between days across the different European regions.

Such fluctuations were not observed by Fraaije *et al.* (2005) in the case of QoI resistance, where the authors reported dramatic increases in the frequency the cytochrome b substitution G143A were sustained following QoI treatments during the growing season. Unlike the development and spread of G143A which was ubiquitous across Western-Europe in the early 2000s, the fluctuations observed for S524T may reflect differences in local and regional azole usages combined with the mixing of airborne inoculum which is influenced by debris from various geographical sources (Suffert *et al.*, 2011). Ascospores carrying S524T would, therefore, be mixed in a background that would fluctuate depending on wind direction, temperature and rain events occurring at the regional scale. This potentially highlights an issue with using airborne sampling as a predictor of local fungicide resistance frequencies.

The lack of H152R in the airborne sample is not surprising given the low levels detected in the field samples as well as the possible effect of its fitness cost on Sdh enzyme activity (Scalliet *et al.*, 2012). Phenotypic traits such as virulence (Schmitz *et al.*, 2015) and ascospore production could be associated with this. Nevertheless, compensatory alterations could arise that would suppress the cost of the resistance allele while conserving its effect on SDHI sensitivity as it has been seen for CYP51 alterations (Cools and Fraaije, 2013; Hawkins and Fraaije, 2018).

While the frequency of S524T in both Irish and Belgian fields may be indicative of potential issues surrounding the performance of the azole fungicides (Jørgensen *et al.*, 2018), it is not the case for the frequency for H152R and SDHI fungicides performance. Indeed, the frequency of H152R is extremely low in samples originating from fields such as Knockbeg and Oak Park in Ireland, where the efficacy of solo SDHI fungicides is known to have declined since 2016 (unpublished data). This suggests that, whilst the potential reduction in efficacy conferred by H152R maybe greatest, alternative substitutions conferring “moderate” resistance may also impact field control conferred by the SDHIs. In the cases of both Knockbeg and Oak Park, the SdhC-T79N is known to occur at high frequencies and is likely to be responsible for the loss in efficacy observed at these sites (unpublished data). Nevertheless, the H152R allele is now detected sporadically in Europe (FRAC, 2020) and it is still possible that increasing usage of SDHI at increasing rates of application in the field might increase its frequency in the population as observed by Gutiérrez-Alonso *et al.* (2017). Although this doesn’t decrease the need to monitor H152R, it does highlight that resistance screening should combine several detection methods. This is equally relevant for the azole fungicides, as alternative resistance mechanisms including CYP51 overexpression (Cools *et al.*, 2012) and multidrug resistance overexpression of MFS1 efflux pump (Omrane *et al.* 2015) have been reported as contributing to a decline in sensitivity towards them. Furthermore, the novel azole fungicide mefentrifluconazole, which has been recently commercialized, might select for different resistance mechanisms than the previously known DMIs.

Overall, the results presented here demonstrate that allele-specific qPCR assays are hands-on, powerful and versatile tools to study target-site resistance or any other SNP-based marker. Future work will use this study as a guideline to develop assays targeting other substitutions (e.g. SdhC-T79N and SdhC-N86A) in *Z. tritici* to evaluate their spatio-temporal distribution and to determine the relevance of resistance management strategies.

8.2.7. Acknowledgements

This project has been conducted as part of the EURO-RES project under the C-IPM ERANET, with financial assistance from each partner’s national funding body: Belgium (Moerman research fund – RESIST project at CRA-W), Denmark (Aarhus University – Dept. of Agroecology), Germany (JKI), Ireland (Teagasc), Sweden (Formas). The authors declare no conflict of interest.

8.2.8. Availability of data

The data sets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request

8.2.9. Supplementary materials

Table S1. Evolution of the estimated allele frequency in pooled-leaf samples with regards to sample dilution factor. Allele frequencies were measured twice in duplicate. The difference of frequency (absolute) observe between the two runs is indicated under %diff.

Country	Location	Sample	Dilution factor	S524T allele		H152R allele	
				%	% diff	%	% diff
Belgium	Thy-le-château	5BE	0	0.6	0.05	0	0
			10	0.86	0.17	0	0
			100	0.75	0.16	0	0
			1000	1.55	2.82	0	0
	Milmort	40BE	0	41.93	2.66	4.17	0.68
			10	40.55	1.02	5.72	0.71
			100	40.99	0.33	5.84	0.91
			1000	39.49	6.78	3.6	2.89
	Xhendremael	41BE	0	48.9	0.42	0	0
			10	50.93	0.01	0.01	0.01
			100	50.57	2.02	0.11	0.07
			1000	54.98	6.02	0.44	0.87
Ireland	Oak Park	32IR	0	96.45	0.2	0.31	0.09
			10	95.11	0.24	0.58	0.09
			100	95.58	0.66	0.85	0.2
			1000	98.81	0.87	1.77	0.67
	WXC	37IR	0	96.17	0.03	0.5	0.17
			10	95.37	0.98	1.49	0.35
			100	94.56	0.07	1.83	0.71
			1000	95.9	0.23	3.61	0.45
	Meath	45IR	0	100	0	14.46	1.5
			10	100	0	16.67	3
			100	100	0	17.86	3.99
			1000	100	0	19.5	11.07

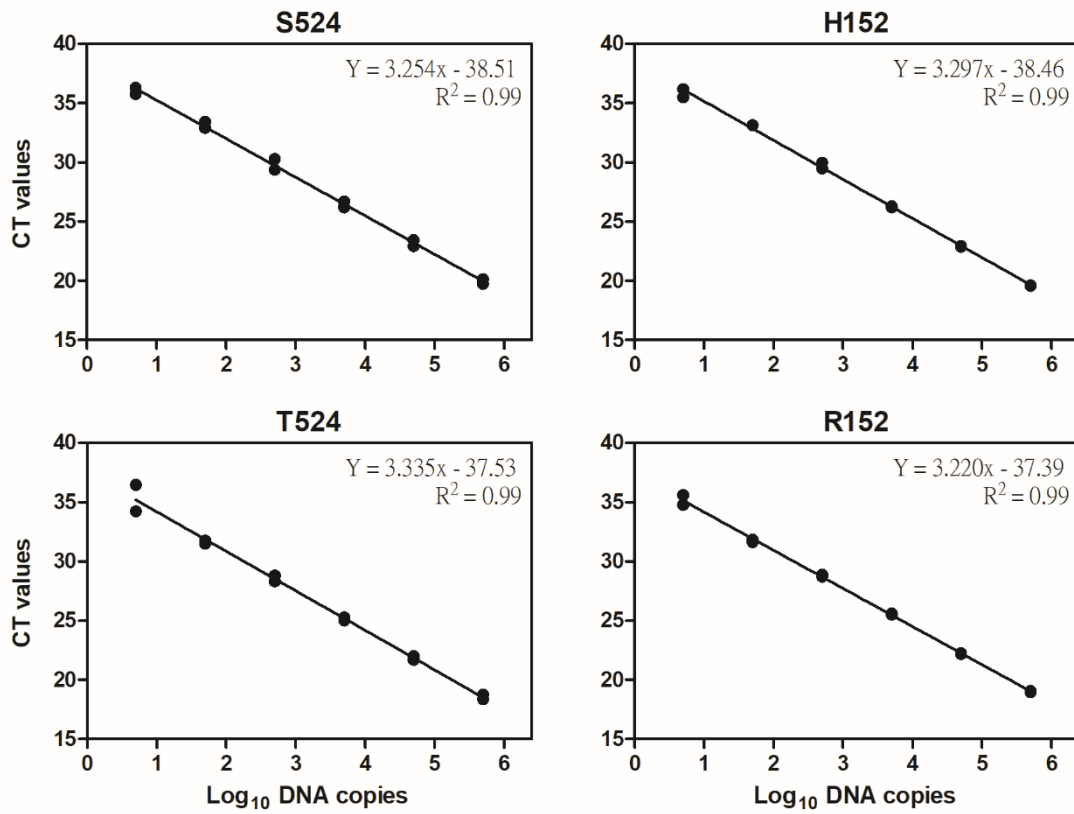


Figure S1. Linear regression between the log-transformed concentrations of PCR amplicons and the cycle threshold (CT) values for each allele. Each value represents the mean CT values for one of the 2 independent qPCR runs performed for each allele in singleplex.

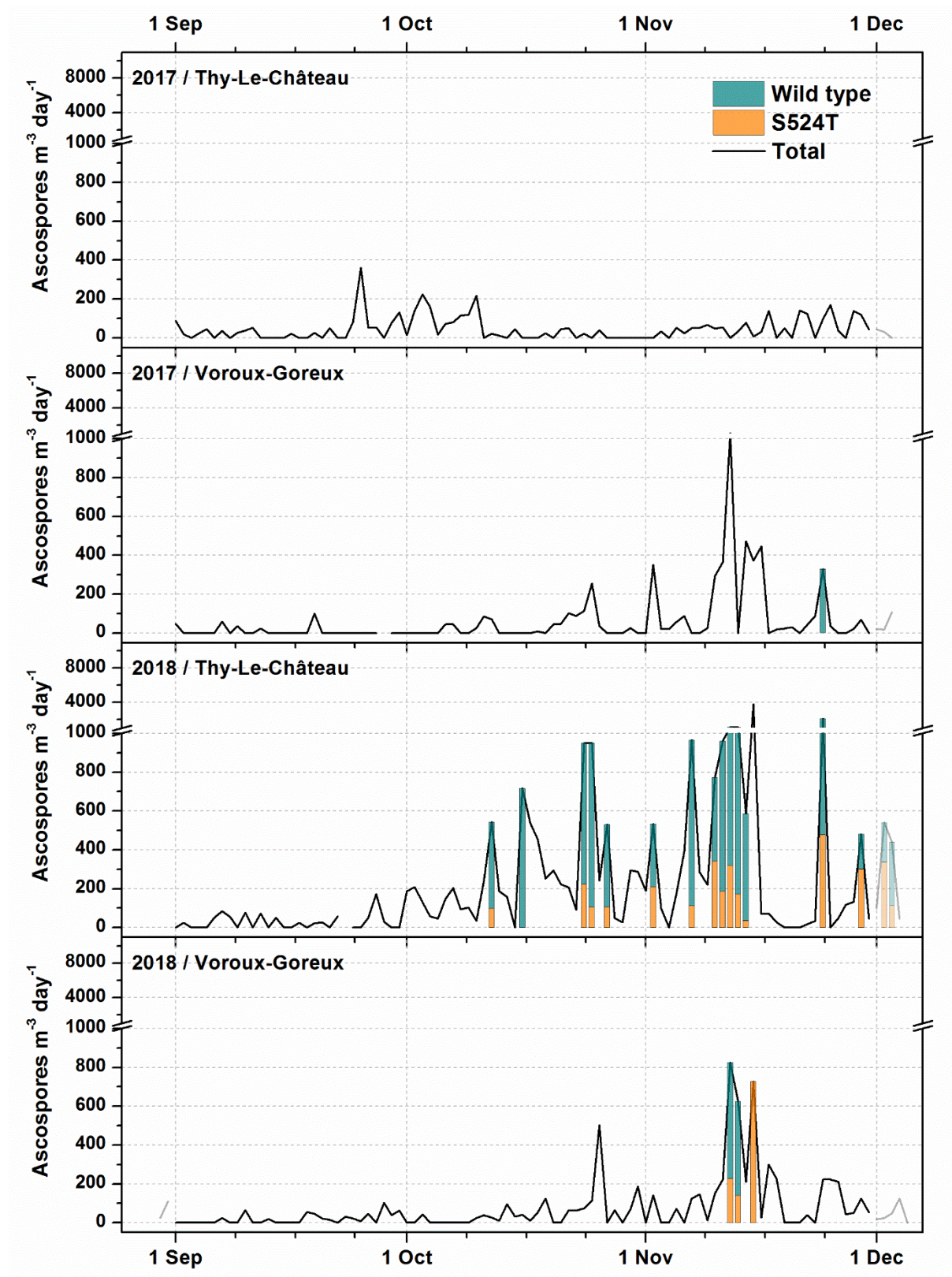


Figure S2. (continuing on the next page)

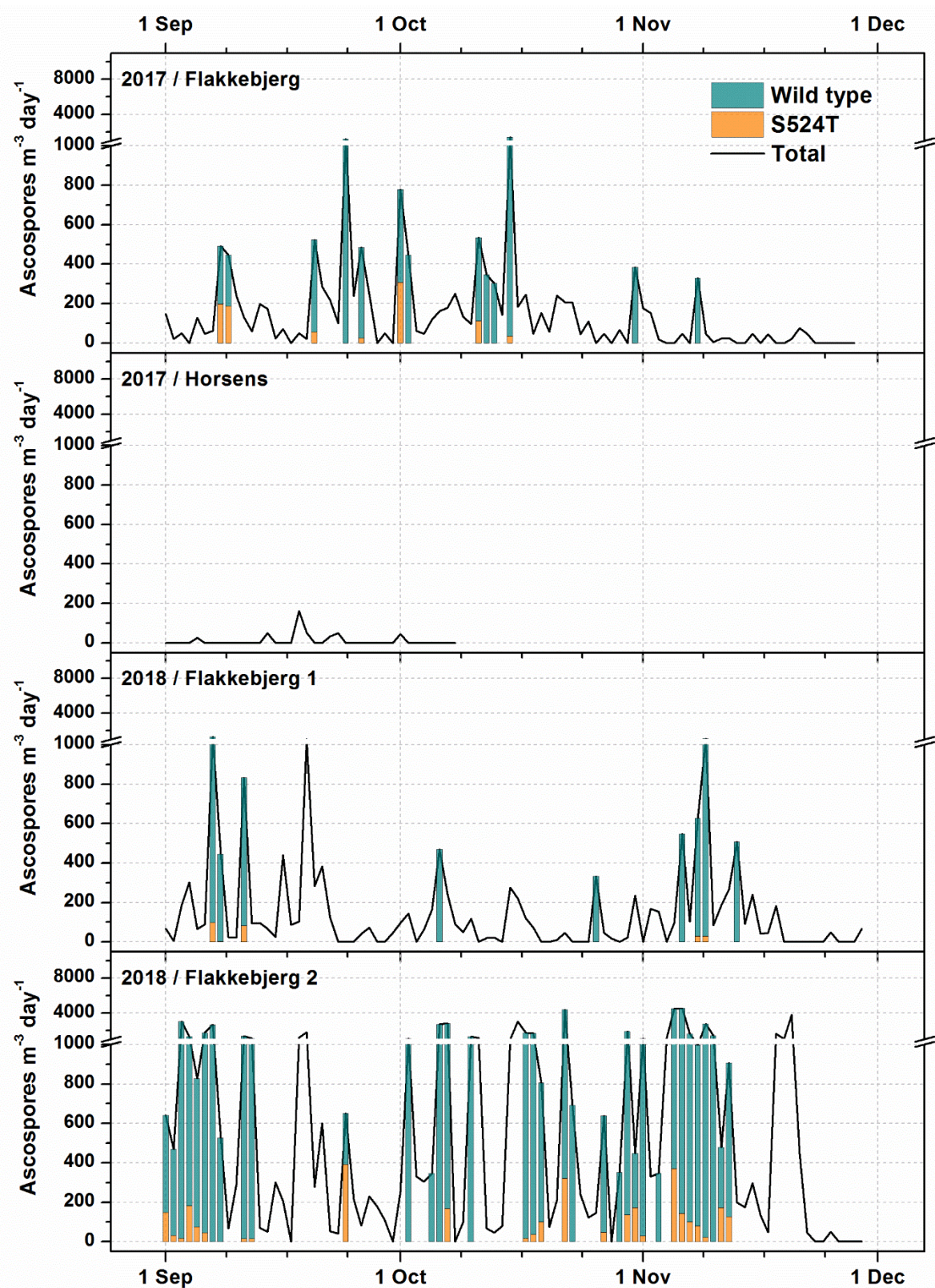


Figure S2. (continuing on the next page)

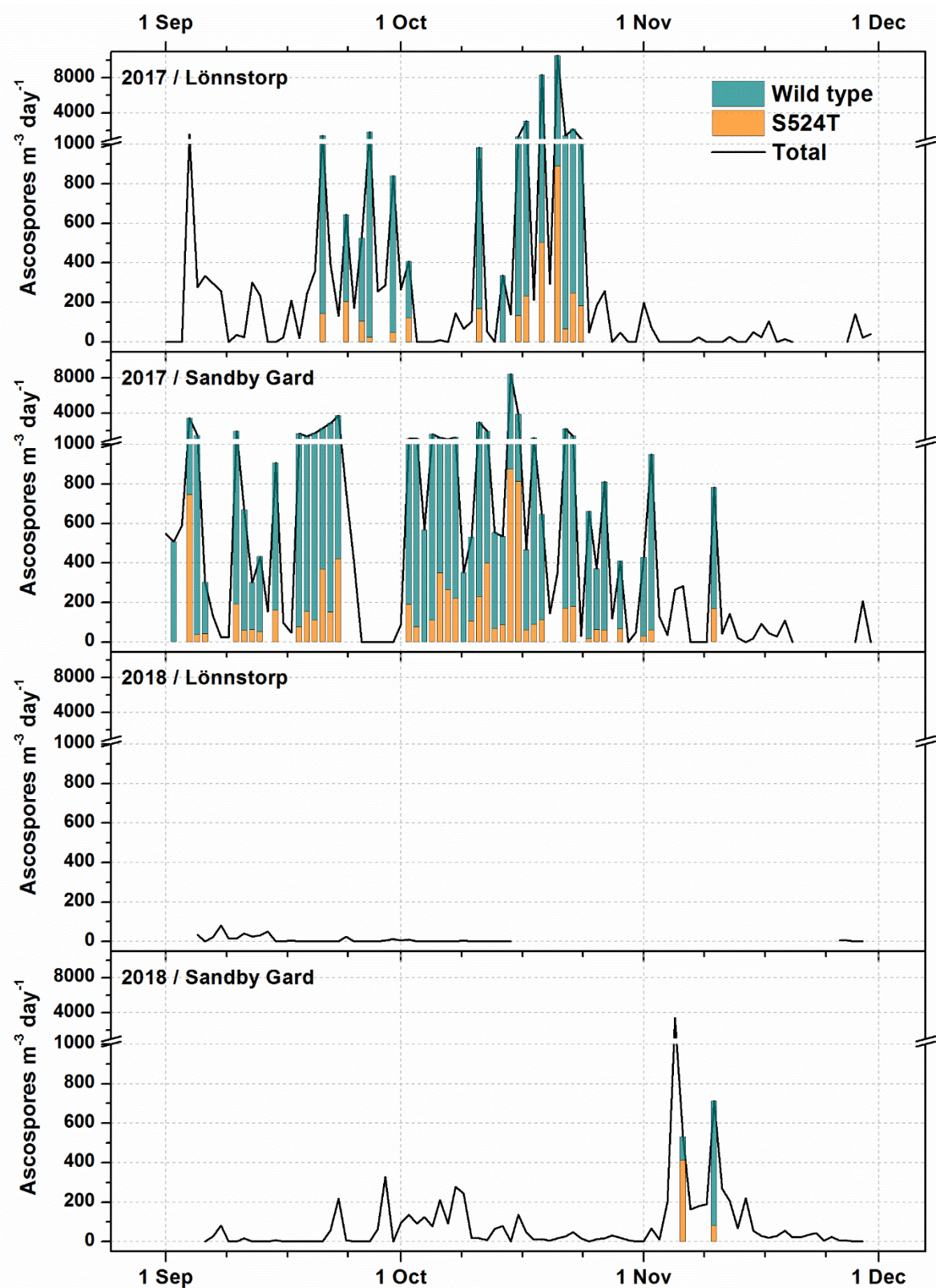


Figure S2. (continuing on the next page)

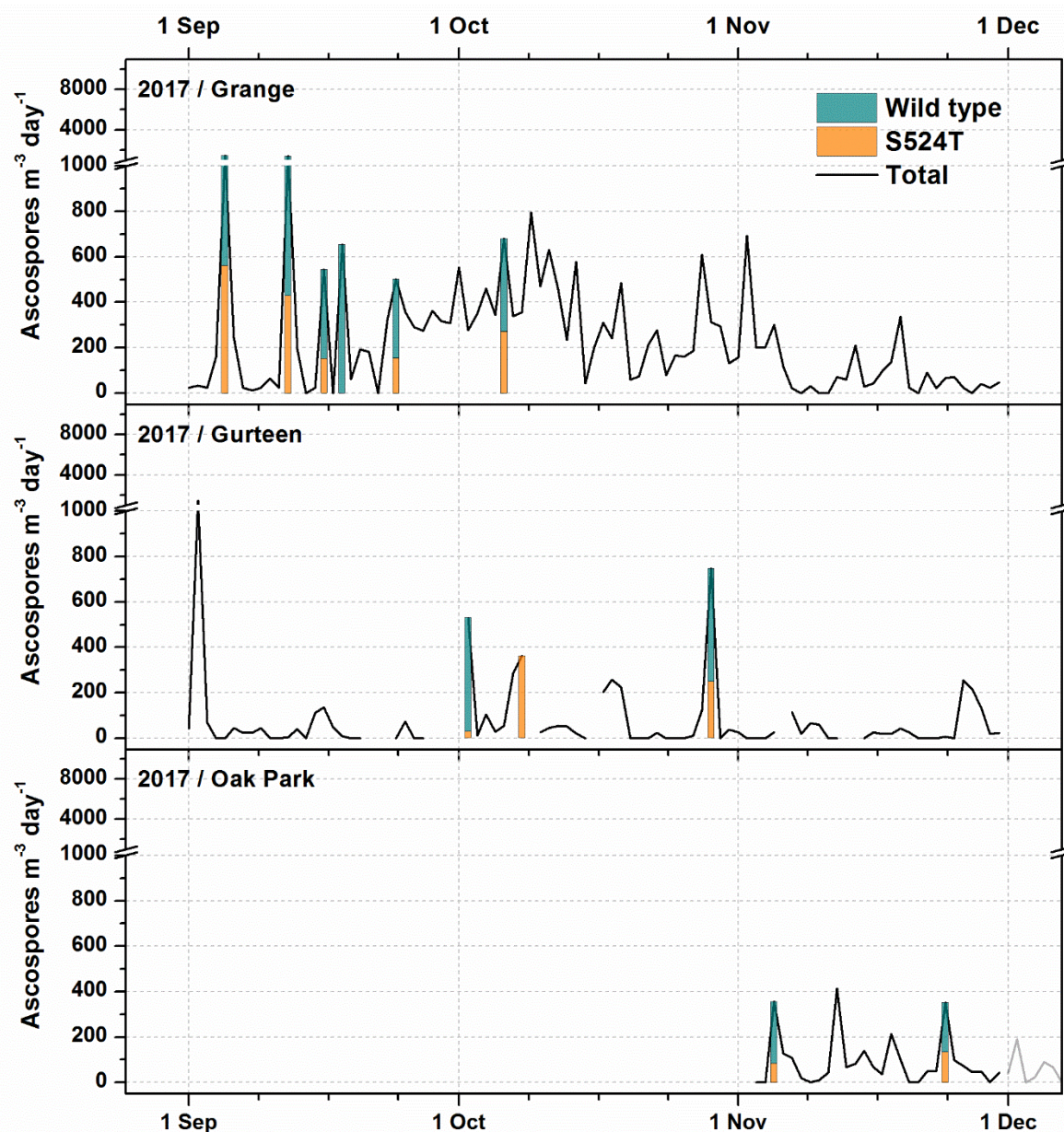


Figure S2. Daily distribution of airborne *Z. tritici* inoculum (ascospores m⁻³ day⁻¹) in all fields of the spore trap network from September 1st to 30 November 30th 2017 and 2018. Stacked bars represent the proportion of S524T mutation in the total *Z. tritici* ascospores trapped during that day. Data that were obtained from samples collected outside of the survey period are represented in semitransparent.

8.2.10. References

- Billard, A., Laval, V., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R. and Debieu, D.** (2012) The allele-specific probe and primer amplification assay, a new real-time PCR method for fine quantification of single-nucleotide polymorphisms in pooled DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1063–8.
- Bosch, F. van den, Oliver, R., Berg, F. van den and Paveley, N.** (2014) Governing Principles Can Guide Fungicide-Resistance Management Tactics. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 175–195.
- Brunner, P.C., Stefanato, F.L. and McDonald, B.A.** (2008) Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: Evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 305–316.
- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A. and Fraaije, B.A.** (2012) Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Manag. Sci.* **68**, 1034–1040.
- Cools, H.J. and Fraaije, B.A.** (2012) Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag. Sci.* **69**, 150–155.
- Cools, H.J. and Fraaije, B.A.** (2013) Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag. Sci.* **69**, 150–155.
- Cools, H.J., Mullins, J.G.L., Fraaije, B.A., Parker, J.E., Kelly, D.E., Lucas, J.A. and Kelly, S.L.** (2011) Impact of recently emerged sterol 14 α -demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3830–7.
- Cowger, C., Hoffer, M. and Mundt, C.** (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathol.*
- Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J. and Kildea, S.** (2016) Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the *SdhC* -H152R and *SdhD* -R47W substitutions. *Pest Manag. Sci.* **72**, 2203–2207.
- Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J. and Kildea, S.** (2016) Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI insensitive field isolates carrying the *SdhC* -H152R and *SdhD* -R47W substitutions. *Pest Manag. Sci.*, n/a-n/a.
- Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J. and Kildea, S.** (2016) Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI insensitive field isolates carrying the *SdhC* -H152R and *SdhD* -R47W substitutions. *Pest Manag. Sci.*, n/a-n/a.
- Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., Proft, M., Moreau, J.-M. and Legrève, A.** (2013a) Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* **137**, 325–341.
- Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., Proft, M., Moreau, J.-M. and Legrève, A.** (2013b) Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* **137**, 325–341.
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S. and Lucas, J. a** (2005) Role of Ascospores in Further Spread of Qol-Resistant Cytochrome b Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **95**, 933–941.
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S. and Lucas, J.A.**

- (2005) Role of Ascospores in Further Spread of Qol-Resistant Cytochrome b Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **95**, 933–941.
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.H., Motteram, J., Clark, W.S. and Lucas, J.A.** (2007) A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 245–254.
- FRAC** (2018) Minutes of the Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Working Group.
- Garnault, M., Duplaix, C., Leroux, P., Couleaud, G., Carpentier, F., David, O. and Walker, A.** (2019) Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Manag. Sci.*, ps.5360.
- Grimmer, M.K., Bosch, F. k. van den, Powers, S.J. and Paveley, N.D.** (2015) Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest Manag. Sci.* **71**, 207–215.
- Gutiérrez-Alonso, O., Hawkins, N.J., Cools, H.J., Shaw, M.W. and Fraaije, B.A.** (2017) Dose-dependent selection drives lineage replacement during the experimental evolution of SDHI fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici*. *Evol. Appl.* **10**, 1055–1066.
- Hawkins, N.J. and Fraaije, B.A.** (2018) Fitness Penalties in the Evolution of Fungicide Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*
- Huf, A., Rehfus, A., Lorenz, K.H., Bryson, R., Voegelé, R.T. and Stämmler, G.** (2018) Proposal for a new nomenclature for CYP51 haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathol.*
- Hunter, T., Coker, R. and Royle, D.** (1999) The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathol.*
- Jørgensen, L.N., Matzen, N., Hansen, J.G., et al.** (2018) Four azoles' profile in the control of Septoria, yellow rust and brown rust in wheat across Europe. *Crop Prot.* **105**, 16–27.
- Kildea, S., Marten-Heick, T., Grant, J., Mehenni-Ciz, J. and Dooley, H.** (2019) A combination of target-site alterations, overexpression and enhanced efflux activity contribute to reduced azole sensitivity present in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *Eur. J. Plant Pathol.* **154**, 529–540.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M. and Walker, A.-S.** (2007) Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* **63**, 688–698.
- Leroux, P. and Walker, A.-S.** (2011) Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* **67**, 44–59.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Arar, K. and Fach, P.** (2003) Evaluation of the performance of LNA and MGB probes in 5'-nuclease PCR assays. *Mol. Cell. Probes* **17**, 307–11.
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J. and Green, A.** (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **22**, 1050–1064.
- Linde, C.C., Zhan, J. and McDonald, B. a** (2002) Population Structure of *Mycosphaerella graminicola*: From Lesions to Continents. *Phytopathology* **92**, 946–955.
- McDonald, B.A. and Mundt, C.C.** (2016) How knowledge of pathogen population biology informs management of Septoria tritici blotch. *Phytopathology* **106**, 948–955.
- O'Driscoll, A., Kildea, S. and Doohan, F.** (2014) The wheat–Septoria conflict: a new front

opening up? *Trends plant*

- Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A.-S. and Fillinger, S.** (2015) Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environ. Microbiol.* **17**, 2805–2823.
- Phelan, S., Barthe, M.-S., Tobie, C. and Kildea, S.** (2017) Detection of the cytochrome *b* mutation G143A in Irish *Rhynchosporium commune* populations using targeted 454 sequencing. *Pest Manag. Sci.* **73**, 1154–1160.
- Pieczul, K. and Wąsowska, A.** (2017) The application of next-generation sequencing (NGS) for monitoring of *Zymoseptoria tritici* Qol resistance. *Crop Prot.* **92**, 143–147.
- Rehfus, A., Strobel, D., Bryson, R. and Stammler, G.** (2018) Mutations in *sdh* genes in field isolates of *Zymoseptoria tritici* and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors. *Plant Pathol.* **67**, 175–180.
- Russell, P.E.** (2005) A century of fungicide evolution. *J. Agric. Sci.* **143**, 11–25.
- Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., et al.** (2012) Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* **7**.
- Schmitz, H., Mehl, A. and Kleemann, J.** (2015) Relevance of point mutations in the target gene of SDHI fungicides for growing cereals. In XVIII. International Plant Protection Congress. (Feldmann, F. and Short Heinrichs, E.A., eds), p. 195. Berlin.
- Scott, P., Sanderson, F. and Benedikz, P.** (1988) Occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici*, on wheat debris in the UK.
- Selim, S.** (2009) ALLELE-SPECIFIC REAL-TIME PCR FOR QUANTIFICATION AND DISCRIMINATION OF STEROL 14 α -DEMETHYLATION-INHIBITOR-RESISTANT GENOTYPES OF MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA. *J. Plant Pathol.* **91**, 391–400.
- Shaw, M. and Royle, D.** (1989) Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathol.*
- Stammler, G., Carstensen, M., Koch, a., Semar, M., Strobel, D. and Schlehuber, S.** (2008) Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy. *Crop Prot.* **27**, 1448–1456.
- Stammler, G. and Semar, M.** (2011) Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bull.* **41**, 149–155.
- Stukenbrock, E.H., Bataillon, T., Dutheil, J.Y., Hansen, T.T., Li, R., Zala, M., McDonald, B.A., Wang, J. and Schierup, M.H.** (2011) The making of a new pathogen: insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. *Genome Res.* **21**, 2157–66.
- Taher, K., Graf, S., Fakhfakh, M.M., Salah, H.B.H., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Nasraoui, B. and Stammler, G.** (2014) Sensitivity of *Zymoseptoria tritici* Isolates from Tunisia to Pyraclostrobin, Fluxapyroxad, Epoxiconazole, Metconazole, Prochloraz and Tebuconazole. *J. Phytopathol.* **162**, 442–448.
- Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., McDonald, B.A. and Sierotzki, H.** (2009) Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* **65**, 155–162.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L.** (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134.

You, Y., Moreira, B.G., Behlke, M.A. and Owczarzy, R. (2006) Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.* **34**, e60.

8.3. Matériel et méthode des méthodes qPCR permettant de calculer des fréquences de mutations T79N/I et N86S

The frequency of mutation T79N, T79I, N86S in Sdh-C were determined using 2 allele-specific qPCR assays. Two new assays were developed, following the guidelines described by Hellin et al. (submitted), for the quantification of T79N/I (simultaneously) and N86S. Each of those two assays used the same set of primers, amplifying a 235 bp fragment, with probes specific to the targeted SNPs (Table 2). Primers and probes were developed using reference sequence corresponding to each allele (T79, N79, I79, N86 and S86). Because of size restriction and low GC content, up to 6 LNA bases were included in the design of each probe to reach a sufficient melting temperature (T_m). The cycling protocol consisted of an activation step at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 3 s) and annealing/extension (60°C for 45 s), with the intensity of fluorescence captured at the end of every cycle. All reaction were performed on a CFX96 thermocycler (BioRad) using Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP Blue (Eurogentec). Each reaction was run in 20 μ L of final volume and included 2 μ L of template DNA and primers and probes at 100 nM and 250 nM, respectively. For the newly developed assays, the cycle threshold (CT) values were determined above a baseline threshold of 50 and 150 relative fluorescence units (RFU) for position 79 and 86, respectively. All PCR runs included serial dilutions of standards and each reaction was performed in duplicates. For each ‘unknown’ sample, the frequency of a mutation was estimated by computing the ratio between the quantity of mutant for this allele, given by the respective probe signal, and the total quantity of Septoria DNA, deduced from the signals from all probes in the assay.

Table 2. Specifications of the oligonucleotides designed for the specific quantification of T79N/I and N86S alleles

Oligo name	Sequence ^a	5'/3' modifications	T_m (°C) ^b
<i>Probes</i>			
SdhC-79T-probe	GT <u>ACCAGG</u> TTATTTG	FAM / BHQ-1	55,9
SdhC-79N-probe	GGT <u>ACCAGT</u> TTTATTTG	HEX / BHQ-1	55,1
SdhC-79I-probe	GGT <u>ACCAGATT</u> ATTTG	TEX / BHQ-2	55,3
SdhC-86N-probe	CTCA <u>ACCG</u> CGT	FAM / BHQ-1	54,8
SdhC-86S-probe	CTCA <u>GCCG</u> CGT	HEX / BHQ-1	56,9
<i>Primers</i>			
SdhC-79-86-F	CACCTCGCAATCTACAAAC	-	51,2
SdhC-79-86-R	TCAACGAATGAAACGTCAC	-	50,7

^a the positions of LNA bases in the oligonucleotide sequence are indicated by underlined bases. The nucleotides related to the amino acid change leading to a resistant phenotype are indicated in bold.

^b Melting temperatures are only indicative and were obtained using the IDT OligoAnalyzer webtool with default parameters and no 5'/3' modifications.