

USAGE DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN MÉTABOLOMIQUE ET PROTÉOMIQUE AVANCÉE EN VUE DE L'IDENTIFICATION ET L'ÉLUCIDATION DE GÈNES POUR AUGMENTER LA RÉSISTANCE À LA FUSARIOSE DE L'ÉPI CHEZ L'ORGE

KUSHALAPPA AC ¹, CHOO TM ², DION Y ³

NUMÉRO : 810244

Durée : 04/2011 – 03/2014

FAITS SAILLANTS

Les technologies de la métabolomique non ciblée ont permis d'identifier de fortes variations de l'abondance d'acides gras libres (AGL) associés à la cuticule des cultivars CI9831 (résistant) et H106-371 (sensibles). Les principaux gènes impliqués dans la synthèse des AGL, tels que l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) et le β -kétol-ACP-synthase II (KASII), catalysant la biosynthèse de malonyl et de stéarate, respectivement, ont été fortement exprimés dans le cultivar résistant. Aussi, les sous-unités monomères d'acides gras aliphatiques impliquées dans les gènes de synthèse de la cuticule de biosynthèse ont également été ciblées et les profils d'expression de CYP86A2, CYP77A, LACS, GPAT6 impliqués dans la conversion des acides gras libres à ω -OH-acyl-glycérol aussi étaient élevés. Ces gènes pourront être utilisés dans les programmes de sélection de l'orge suite à la validation de la fonction de résistance, par silençage génique transitoire, qui est en cours. Nous entendons également identifier les facteurs de transcription (FT) qui sont régulés positivement dans le cultivar résistant, par le séquençage de l'ARN (séquençage terminé et analyse bio-informatique en cours).

Une nouvelle méthode d'amplification quantitative de l'ADN (qPCR) a été développée pour quantifier la biomasse fongique dans les épillets, afin de mesurer les niveaux de résistance. L'erreur expérimentale a été principalement réduite par l'inoculation ponctuelle de trois paires d'épillets alternes, par rapport à l'inoculation par pulvérisation qui donne souvent des résultats peu utilisables en raison de très grande erreur expérimentale. La résistance des cultivars peut ainsi être discriminée en 7 jours après l'inoculation (*jai*) plutôt qu'en 14 *jai*. Cette méthode peut être utilisée chez le blé et l'orge pour évaluer la résistance des épillets à l'infection.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Utiliser la métabolomique non ciblée afin de découvrir des métabolites de résistance et les situer dans la voie métabolique puis identifier les gènes utiles en sélection végétale. Des cultivars et lignées haploïdes doublées (HD) résistantes à la fusariose et des lignées sensibles ont été cultivés en serre, traités par inoculation ponctuelle de macroconidies de *F. graminearum* (*Fg*) ou une solution témoin. La sévérité de la maladie a été évaluée. Une méthode, basée sur qPCR, a été développée pour quantifier la biomasse fongique. L'abondance des métabolites a permis d'identifier les métabolites associés à la résistance constitutive (CRR) et induite (RRI), puis les gènes ont été identifiés à l'aide des bases de données. Le silençage génique est appliqué pour prouver les fonctions de résistance. En complément, le séquençage de l'ARN d'un cultivar d'orge est utilisé, sur le matériel inoculé (*Fg* et témoin), pour identifier les gènes activés (en cours).

1. Université McGill

2. Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa

3. Centre de Recherche sur les grains (CÉROM)

RETOMBEES SIGNIFICATIVES POUR L'INDUSTRIE

Pour la communauté scientifique : L'approche de la métabolomique non ciblée a permis d'identifier plus de deux mille métabolites et, dans une étude, 1800 métabolites permettent de discriminer le cultivar résistant (CI9831) du cultivar sensible (H106-371) par l'analyse discriminante canonique. Les métabolites associés à la résistance constitutive (CRR) et induite (RRI) identifiés par le projet sont parties des voies métaboliques des phénylpropanoïde, flavonoïdes, acides gras, terpénoïde et alcaloïdes. Plusieurs de ces métabolites ont des propriétés antimicrobiennes. Dans les tissus floraux (épillet), en particulier dans le lemme et le paléole, ces métabolites suppriment ou répriment les agents pathogènes dès qu'ils entrent à travers les stomates à l'intérieur du lemme et paléole. Nous touchons donc à des mécanismes de résistance à l'infection initiale (type 1), pour laquelle peu de progrès ont été faits comparativement à la résistance de type 2 chez l'orge. Les métabolites dont l'abondance est fortement accrue (études avec les cultivars résistant et sensible CI9831 et H106-371), sont associés à des gènes clés de la biosynthèse d'acides gras libres (AGL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) et le β -kétacyl-ACP-synthase II (KASII), catalysant la biosynthèse de malonyl et de stéarate, respectivement. Ces gènes sont fortement exprimés dans les cultivars résistants. Ces gènes représentent un potentiel intéressant de hausser le niveau de résistance des cultivars d'orge. Nous sommes à valider la fonction de résistance par silençage génique transitoire. Plus encore, nous entendons d'identifier les facteurs de transcription (TF) qui sont régulés positivement dans le cultivar résistant basé sur le séquençage de l'ARN. Cette piste de recherche est une avancée importante des connaissances et du potentiel de développement de cultivar résistants : l'activation des voies métaboliques qui permettent à la plante de réagir plus rapidement et fortement au champignon pathogène.

Pour l'industrie des semences : les gènes identifiés plus haut pourront permettre le développement de marqueurs ADN. Ces technologies seront très utiles aux programmes d'amélioration génétique des secteurs publics ou privés pour le développement de cultivars d'orge résistants à la fusariose de l'épi. C'est le cas des gènes et de « l'environnement génétique » associés à certains de ces gènes tels les facteurs de transcription. Aussi pour l'évaluation formelle de matériel génétique en développement, la technologie d'amplification de l'ADN développée (qPCR) permet une meilleure évaluation de la résistance, plus rapide et plus précise, qui s'ajoute aux méthodes actuellement utilisées pour l'évaluation des lignées et cultivars.

POINT DE CONTACT

Dr. Kushalappa, Ajjamada C.
Professeur associé
Département des sciences végétales
Université McGill
Ste. Anne de Bellevue (Québec) H9X 3V9
Tél. : 514 398-7867
Télécopieur : 514 398-7897
Courriel : ajjamada.kushalappa@mcgill.ca

PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.