

L'IDENTIFICATION SPÉCIFIQUE DE GÈNES ACTIFS DE RÉSISTANCE À LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DES CÉRÉALES SOUS QTL-Fhb2

Kushalappa AC, Dhokane D, Karre S, McCartney C et Dion Y.

Projet : IA113025

Durée : 04/2014 – 03/2017

FAITS SAILLANTS

La fusariose de l'épi du blé, causée par le champignon *Fusarium graminearum* (téléomorphe *Gibberella zeae*), est la maladie la plus importante chez le blé et l'orge en Amérique du Nord. Elle cause des pertes de rendement, une réduction de la qualité des grains, notamment pour le marché panifiable du blé et de la malterie de l'orge, et les toxines présentes dans le grain ont des effets néfastes sur la santé. L'usage de cultivars résistants est un élément crucial et incontournable de la lutte contre cette maladie. La résistance au *Fusarium* est complexe et partielle. Un grand nombre de locus quantitatifs (QTL) ont été associés à la résistance, plusieurs QTL ont démontré un effet important quant à la résistance à la maladie, dont le QTL-Fhb2, localisé sur le chromosome 6BS du blé, qui est l'objet de cette étude. Une problématique majeure de l'utilisation de marqueurs associés à de larges portions du génome identifiés comme QTL est la méconnaissance des fonctions de gènes portés par ces régions du génome. Le projet a permis d'identifier plusieurs gènes de résistance, dont le gène *Ta4CL*, un gène central de la voie métabolique des phénylpropanoïdes vers la polymérisation formant les lignines. Nous avons observé, par séquençage, le polymorphisme du gène *Ta4CL* chez deux lignées pures recombinantes (RILs) portant des allèles différents au locus quantitatif Fhb2 (QTL-Fhb2). De plus, le silençage génique du gène *Ta4CL* chez la lignée pure résistante (R-RIL) a induit la sensibilité à *Fusarium*, une augmentation de la biomasse du champignon chez l'hôte et une réduction des amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA), confirmant le rôle du gène de résistance associé au QTL-Fhb2. Nous avons aussi identifié un gène de facteur de transcription, TabHLH, lequel est impliqué dans la régulation de gènes de synthèse de métabolites associés à la résistance à la fusariose, dont le gène *Ta4CL*. L'inactivation de ce gène a elle aussi induit une plus grande sensibilité à la maladie et une augmentation de la biomasse du champignon chez l'hôte.

Le projet a donc permis d'identifier explicitement des gènes dont la fonction connue permettra d'introduire et de conserver, chez des lignées améliorées, des gènes actifs pour augmenter la résistance à la fusariose de l'épi, au contraire de larges portions d'ADN qui peuvent porter des gènes inopérants ou même indésirables.

OBJECTIF ET MÉTHODOLOGIE

Les objectifs du projet étaient d'identifier les gènes activés par l'infection du champignon *Fusarium graminearum* (*Fg*), par le biais de l'observation de métabolites associés à la résistance (métabolites-AR). Il s'agit ensuite de vérifier la fonction des gènes par silençage génique viral (VIGS). Deux lignées recombinantes pures (RIL) et opposées, différant quant à la résistance (résistant vs sensible) et portant des allèles différents du QTL-Fhb2 ont été inoculées à l'anthèse par le *Fg* ou soumises à un traitement témoin. Les profils métaboliques des lignées isogéniques opposées ont été établis par spectrométrie de masse de haute résolution (LC-HRMS). On a observé, chez les deux RIL, des variations

importantes des niveaux de certains métabolites, dont les amides d'acides hydroxycinnamiques (HCAA), monolignols et lignanes. Ces composés sont associés à une vie métabolique dont le gène *Ta4CL* joue un rôle important. Le gène *Ta4CL* a été séquencé et observé polymorphique chez les RIL. Le gène *TabHLH* a aussi été noté polymorphique. Les deux gènes, inactivés par silençage génique chez la lignée isogénique résistante, ont prouvé leur fonction dans la résistance à la fusariose de l'épi.

RETOMBÉES SIGNIFICATIVES POUR L'INDUSTRIE

Le développement de cultivars résistants ou plus tolérants à la fusariose est un objectif majeur poursuivi par tous les programmes d'amélioration génétique du blé et des céréales à paille menés mondialement depuis les vingt dernières années. Au Québec, les efforts de recherche de sources de résistance à la maladie et de développement de cultivars plus résistants ont débuté dès les années '80 au dernier millénaire. Au Canada et sur le continent nord-américain, l'effort pour lutter contre la maladie a pris un essor considérable à la suite de fortes épiphyties en 1996 et dans les années suivantes, dont l'année dernière (2016) qui a connu une forte épidémie pandémique, soit une extension importante de la fusariose de l'épi dans des régions de l'Ouest canadien jusque-là peu atteintes (Alberta). Malgré tous ces efforts de recherche, les progrès sont lents. La résistance à la fusariose de l'épi est partielle et sous le contrôle d'une grande quantité de gènes. Les méthodes conventionnelles de sélection de parents résistants, d'hybridation et de sélection classique ont amené des gains progressifs constants, mais des progrès faibles et lents pour développer des cultivars adaptés à l'utilisation commerciale. On a cru que la puissance des moyens de la génomique viendrait à appuyer un développement rapide de cultivars résistants, mais la méconnaissance et la complexité des mécanismes de résistance, ainsi que l'interaction et l'ensemble d'une multitude de gènes ont fait en sorte que ces approches ont montré leurs limites. De larges portions de génome qui sont introduites dans des lignées afin de hausser le niveau de résistance peuvent porter des gènes non fonctionnels ou introduire aussi des gènes indésirables pour certains caractères autres que la résistance. C'est là la limite qu'apporte une méconnaissance des fonctions des gènes portés par une région génomique étendue. On y voit aussi la limite à tenter de recombiner ces portions de génome de manière fine sans y introduire des gènes indésirables. Par ailleurs, il faudra connaître et combiner plusieurs mécanismes de résistance différents pour arriver à atteindre les niveaux de résistance à la fusariose qui sont espérés par les producteurs céréaliers et par l'industrie.

C'est sur ces constats que l'approche développée ici permet de faire des progrès significatifs. D'une part, l'observation du métabolome et du transcriptome de plantes hôtes résistantes et sensibles, deux lignées isogéniques dans le cas de ce projet, ont révélé des métabolites associés à la réaction de résistance. Les voies métaboliques de ces composés permettent de déduire la fonction et les produits impliqués dans le mécanisme de résistance. Le suivi, l'identification et le séquençage des transcrits montrant des variations significatives entre les individus opposés (RIL résistant vs sensible) permettent de déduire la séquence des gènes. Ces informations donnent enfin des informations sur la nature et la fonction des gènes de résistance. Afin de valider la fonction et l'effet des gènes potentiellement impliqués dans la résistance à la fusariose, le silençage génique des plantes hôtes résistantes a permis de vérifier la fonction et l'effet des gènes identifiés, donc de prouver l'efficacité des gènes dans la lutte à la fusariose.

Il s'agit d'une information de pointe ayant un fort impact sur l'efficacité des travaux que pourront entreprendre les sélectionneurs ou les scientifiques pour la suite des choses, soit le développement de cultivars améliorés. D'abord, l'information obtenue par le projet

discrimine les gènes utiles à la résistance plutôt qu'une information moins précise ciblant un caractère polygénique (QTL). Le projet a permis de cibler les gènes actifs de résistance et de se débarrasser d'informations inutiles associées au QTL-6BS. Ensuite, pour les programmes d'amélioration génétique, le fait de connaître la séquence directe des gènes de résistance permet de développer des marqueurs qui sont directement à la source du traçage de la résistance; il ne s'agit plus de sélection indirecte de marqueurs associés (liés) aux gènes. Les marqueurs utiles à la sélection assistée seront plus efficaces et fiables.

L'information sur ces gènes permettra de rechercher les gènes remplissant des fonctions équivalentes soit chez la même espèce ou chez les espèces apparentées telles que le triticale ou chez l'orge, qui est une culture importante, souvent affectée sévèrement par la fusariose. Il pourra s'agir de gènes homologues, homéologues ou orthologues. À cet effet, deux gènes conférant une bonne résistance ont déjà été identifiés chez l'orge, les gènes *HvCERK1* et *HvWRKY23*. Ces gènes ont aussi subi la validation de leurs fonctions et effets (silencage, etc.). L'information de ces gènes de l'orge sera recherchée chez le blé.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET SUIVI À DONNER

L'information précise sur quelques gènes permet d'envisager une approche novatrice pour le développement de cultivars améliorés et résistants à la fusariose de l'épi. Nous sommes en processus d'éditer le génome en remplaçant les gènes sensibles par des gènes résistants. La technique d'édition de génome CRISPR-Cas9 sera mise à profit; les processus de modification et de régénération sont en voie d'être régularisés au laboratoire. Nous utilisons le cultivar de blé Pasteur, un blé à fort rendement, à paille courte et résistant à la verse, mais sensible à la fusariose selon nos standards. Le CRISPR-Cas9 fait la manchette partout en sciences de la vie et offre un potentiel nouveau pour modifier, éditer de façon très précise et spécifique le génome. Nous pourrions remplacer au même endroit dans le génome un gène défectueux (sensible) par un gène conférant la résistance à la fusariose. Il ne s'agit donc pas d'introduire un transgène, mais bien de faire la cisgenèse : transférer un gène de la même espèce comme le feraient les méthodes d'hybridation et de recombinaison génétique classiques. L'édition génomique n'introduit pas de marqueurs tels les gènes d'antibiotiques.

Nous pourrions envisager d'identifier ainsi par l'approche de la métabolomique, des transcrits et du séquençage, plusieurs gènes de résistance à la fusariose. Cette étape « pas à pas » pourra permettre de disposer de séquences utiles comme marqueurs de sélection et plus avant de cumuler les gènes de résistance. Ultimement, on peut envisager éditer le génome avec l'ensemble de ces gènes dans des cultivars adaptés à la culture au Québec.

POINT DE CONTACT

Nom du responsable du projet : Ajjamada C. Kushalappa

Téléphone : 514 398-7867

Courriel : ajjamada.kushalappa@mcgill.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme Innov'Action agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir 2 conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, et Agriculture et Agroalimentaire Canada.