

**RÉDUCTION DU CONTENU EN MYCOTOXINE CAUSÉE FUSARIUM GRAMINEARUM
DANS LES GRAINS DE BLÉ, PAR L'IDENTIFICATION DE MÉTABOLITES DE
RÉSISTANCE ASSOCIÉS À DES ENZYMES ET GÈNES D'INTÉRÊT**

Kushalappa A, McCartney, Y. Dion

No de projet : 811035

Durée : 04/2012 – 03/2015

FAITS SAILLANTS

Des lignées de blé quasi isogéniques (NILs), porteuses du QTL-5A, résistantes et sensibles à la fusariose de l'épi du blé (FÉB) ont été mises à profit pour identifier les gènes et la fonction des gènes de résistance de cette région du génome (QTL), connue pour son association à une meilleure résistance à la FÉB. Un gène de la famille MYB, associé aux facteurs de transcription (régulateurs affectant plusieurs gènes de résistance), MYBFhb5, a été identifié, entièrement séquencé et fiché au NCBI. Les profils métabolomiques des NILs ont montré l'accumulation de plusieurs phénylpropanoïdes en plus grande quantité chez les lignées résistantes, particulièrement après inoculation du champignon. Le silençage génique a réduit l'abondance de la coumaroylagmatine, de la coumaroylputrescine, de la syringine et a induit une augmentation de la biomasse du champignon pathogène, confirmant le rôle du gène MYBFhb5 pour la résistance associée au QTL-Fhb5. L'inoculation des cultivars Sumai3 et Roblin avec des isolats de *F. graminearum* producteurs et non-producteurs de toxine, a montré une plus forte accumulation de phénylpropanoïdes chez le cultivar résistant Sumai3, révélant aussi la pertinence de l'étude de ces métabolites et de la génomique qui lui est associée. Une méthode PCR quantitative (qPCR) a été développée pour évaluer la sévérité de la maladie en se basant sur la biomasse fongique. La méthode, qui constitue une avancée utile aux programmes d'amélioration génétique, réduit l'erreur expérimentale et permet de différencier la résistance chez les épillets du blé et de l'orge. Des activités supplémentaires de séquençage et de métabolomique chez l'orge ont été possibles avec le financement du projet, et un manuscrit a été soumis. Un facteur de transcription (WIN) responsable du renforcement de la cuticule a été identifié. Le gène responsable pourrait être introduit pour augmenter la résistance.

OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif de ce projet était de séquencer l'ADN de la région génomique du QTL-5A chez des NILs résistantes et sensibles à la FÉB afin d'identifier le polymorphisme des gènes, ainsi que d'utiliser la métabolomique et la génomique fonctionnelle pour identifier des gènes potentiels de résistance ainsi que leur rôle, dans une perspective d'usage dans les programmes d'amélioration. Les NILs, porteuses du QTL-5A, résistantes et sensibles à la FÉB ont été cultivées en cabinet. Des feuilles ont été prélevées (à deux semaines) pour l'extraction de l'ADN et le séquençage de la région du QTL-5A au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. L'alignement des séquences a été résolu par Genotypic Inc. Les gènes de la région du QTL ont été identifiés et le séquençage a permis de discerner le polymorphisme des gènes chez les lignées résistantes/sensibles. Un gène de la famille MYB, polymorphique, a été associé aux métabolites du groupe des phénylpropanoïdes.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE OU LA DISCIPLINE

Dans le cadre de ce projet, un nouveau gène désigné MYBFhb5A, associé à la famille des facteurs de transcription MYB, a été identifié comme candidat responsable de la résistance chez le QTL-Fhb5A.

Ce QTL est une des régions génomiques considérées majeures pour la résistance à la fusariose de l'épi chez le blé et il a été utilisé dans les programmes d'amélioration pour le développement de matériel génétique plus résistant. La connaissance du rôle d'un gène de résistance permet de mieux cumuler les résistances partielles pour développer des cultivars plus résistants. Aussi, l'isolement d'un gène offre de meilleures possibilités et d'une meilleure performance de l'introgession de la résistance, en ciblant les gènes fonctionnels et en permettant l'éventuelle édition du génome.

Nous avons également identifié un autre gène de facteur de transcription, le bHLH, dans la même région génomique et nous explorerons la fonction de ce gène ultérieurement, dans de nouvelles études. Une méthode PCR quantitative (qPCR) a été développée pour évaluer la sévérité de la maladie en se basant sur la biomasse fongique. La méthode, qui constitue une avancée utile aux programmes d'amélioration génétique, réduit l'erreur expérimentale et permet de différencier la résistance chez les épillets du blé et de l'orge. La nouvelle méthode quantitative d'amplification de l'ADN qui a été développée permet de quantifier la biomasse fongique dans les épis, dans les tissus de la plante, ce qui constitue une méthode d'évaluation de la résistance des épillets propre à réduire l'erreur expérimentale. La procédure consiste à faire l'inoculation ponctuelle de trois épillets alternes plutôt que l'inoculation par pulvérisation qui engendre une forte variation expérimentale. La résistance peut être évaluée après sept jours plutôt que 14 jours ou plus dans le cas de la pulvérisation et de l'évaluation de la sévérité de l'infection. Cette méthode pourrait être utilisée par l'industrie des semences et les améliorateurs, tant chez le blé que chez l'orge pour l'évaluation de la résistance à l'infection primaire (infection des épillets).

On a séquencé l'ARN d'une lignée d'orge résistante à la fusariose de l'épi (CI9831) et son profil métabolique a été étudié. Plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés, dont un de la famille WRKY, qui régule le dépôt d'acides hydroxycinnamiques qui contribuent au renforcement des parois cellulaires; le caractère est polymorphique chez le cultivar sensible Zhaddar2. Le gène et son rôle sont à l'étude par silençage génique. Le gène WIN1, qui contrôle plusieurs métabolites en lien avec la cuticule et son épaisseur, prévenant l'entrée et la progression du champignon pathogène, a été identifié chez l'orge; on recherchera des gènes similaires chez le blé.

Les gènes de facteurs de transcription qui ont été identifiés dans ce projet sont des gènes à fort impact qui font office de régulateurs majeurs de gènes en aval des processus de résistance associés à des métabolites antimicrobiens ou encore à des mécanismes de protection physique des tissus cellulaires de la plante. Ces gènes à fort impact, s'ils sont non fonctionnels chez les cultivars sensibles commerciaux, pourraient être remplacés pour augmenter la résistance à la fusariose de l'épi. Les gènes non fonctionnels des cultivars sensibles sont possiblement attribuables à l'hybridation, au transfert et dérivés génétiques naturelles ou aux mutations. Le remplacement de ces gènes ou l'édition génomique de quelques nucléotides pourraient donner la résistance. Les gènes identifiés dans cette étude ne confèrent pas une résistance verticale, mais plutôt une résistance horizontale plus durable puisqu'attribuable à l'expression de plusieurs métabolites et mécanismes de résistance.

Dans le cadre de ce projet, nous avons normalisé les protocoles de régénération des cellules ainsi que l'édition génomique. Un outil récent, performant et particulièrement prometteur pour l'édition génomique est le CRISPR-Cas9 qui ne laisse aucun résidu d'ADN chez le génome hôte et qui offre,

par conséquent, un potentiel supérieur aux méthodes traditionnelles d'amélioration génétique en ciblant précisément et exclusivement les gènes d'intérêt sans entraîner des gènes indésirables.

Le secteur et l'industrie seront approchés afin de financer le développement de nouveaux cultivars par le cumul des gènes et la cisgenèse. L'organisme SeCan a signifié son intérêt à ces développements.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Responsable du projet : D^r Ajjamada Kushalappa

Téléphone : 514 398-7867

Télécopieur : 514 398-7897

Courriel : ajjamada.kushalappa@mcgill.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'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 du Québec, et Agriculture et Agroalimentaire Canada.