

**DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES DE DÉTECTION MOLÉCULAIRE DE LA  
RÉSISTANCE AUX HERBICIDES DES GROUPES 5, 14 ET 27 POUR  
L'AMARANTE TUBERCULÉE**

**NUMÉRO DU PROJET : 19-008-2.2-C-CÉROM**

**DURÉE DU PROJET : 3 AVRIL 2019/31 AOÛT 2024**

**RAPPORT FINAL**

Réalisé par :

Sandra Flores-Mejia, CÉROM

Martin Laforest, AAC

Dominique Michaud, Université Laval

Geneviève Gagnon, Université Laval

Marie Bipfubusa, CÉROM

Stéphanie Mathieu, MAPAQ

Annie Marcoux, LEDP-MAPAQ

Avec la collaboration de :

Firmo Sousa, CÉROM

Gabriel Verret, CÉROM

**JANVIER 2024**

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

# DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES DE DÉTECTION MOLÉCULAIRE DE LA RÉSISTANCE AUX HERBICIDES DES GROUPES 5, 14 ET 27 POUR L'AMARANTE TUBERCULÉE.

NUMÉRO DU PROJET : 19-008-2.2-C-CÉROM

## RÉSUMÉ DU PROJET

L'amarante tuberculée (*Amaranthus tuberculatus* (Moquin-Tandon) J.D. Sauer; AMATU) est considérée comme l'une des mauvaises herbes les plus problématiques et difficiles à contrôler. Au Québec, l'AMATU a été identifiée pour la première fois en 2017 en Montérégie-Ouest. Jusqu'en 2022, 76 populations ont été identifiées au Québec et toutes ont démontré de la résistance à au moins un groupe d'herbicides (2, 5, 9, 14 et 27), incluant la résistance à l'atrazine (groupe 5) et à la mésotrione (groupe 27), appliquées en mélange. Quelques populations ont aussi été identifiées comme étant résistantes à au moins quatre groupes d'herbicides.

La clé de la lutte intégrée contre l'AMATU est d'établir des stratégies de désherbage le plus rapidement possible après la détection du foyer. Ces stratégies doivent être adaptées au profil de résistance de la population, afin de maximiser leur efficacité. Le profil de résistance peut être obtenu via des tests classiques ou moléculaires. L'avantage principal de l'approche moléculaire est au niveau de la rapidité avec laquelle les résultats sont obtenus. Toutefois, ce type de test est spécifique à une espèce de mauvaise herbe et il faut connaître la mutation conférant la résistance. L'objectif général du projet était donc de développer des méthodes moléculaires permettant de détecter rapidement la résistance aux groupes 5, 14 et 27 chez l'AMATU.

Concernant le groupe 14, un test moléculaire a été développé puis transféré, en 2019, au Laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ (LEDP-MAPAQ). Depuis 2020, 114 tests ont été réalisés par le LEDP avec ce test (D. Miville, *comm. pers.* 2024). Dans le cas de la résistance à l'atrazine, l'altération du métabolisme serait liée à une intensification de l'activité des glutathion-S-transférases et le gène *AtuGSTF2*, associé à cette famille d'enzymes, a déjà été ciblé comme étant responsable de cette résistance dans la littérature. En accord avec les données publiées, l'analyse de nos données semble confirmer le gène *AtuGSTF2* comme le gène candidat conférant la résistance à l'atrazine dans les populations étudiées. Différents marqueurs moléculaires ont été développés et sont actuellement en cours de validation.

Les résultats de nos études de l'expression des gènes exprimés de façon différentielle dans les plantes résistantes, sujettes ou non à un traitement avec de la mésotrione (groupe 27), nous a permis d'identifier des gènes et mécanismes de réponse au stress pouvant être impliqués dans la résistance. Nous avons réalisé par la suite une analyse de type GWAS (*Genome Wide Association Study*) suite à un génotypage par séquençage (GBS), afin d'identifier des régions possiblement impliquées dans les mécanismes de résistance à la mésotrione.

## OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif général du projet était le développement de méthodes moléculaires pour détecter la résistance de l'AMATU aux groupes 5,14 et 27. Pour y arriver, les objectifs spécifiques suivants ont été considérés :

### **1. Développement d'un test génétique pour la résistance aux herbicides du groupe 14 à partir des informations disponibles dans la littérature**

Les herbicides du groupe 14 sont des composés inhibiteurs de la protoporphyrinogène oxydase (PPO). Patzoldt et coll. (2006) ont démontré que le gène PPX2L (*Protoporphyrinogen oxidase long form*) présente une délétion du résidu aminé glycine en position 210 ( $\Delta G210$ ) chez les plantes résistantes aux herbicides du groupe 14. Le gène PPX2L code pour des isoformes de la PPO retrouvées dans les plastides et les mitochondries, permettant à un seul gène de conférer une résistance à deux sites cibles des herbicides de ce groupe. Ainsi, l'objectif du projet était de détecter le gène PPX2L par amplification PCR à l'aide de deux paires d'amorces spécifiques.

### **2. Production des populations F1 d'AMATU et leur caractérisation comme résistantes ou sensibles aux groupes d'herbicides 5 et 27 via la méthode classique**

L'AMATU est une plante dioïque, avec les organes mâles et femelles portés par des individus différents. L'approche de cartographie génétique des espèces montrant ce mode de reproduction est particulière parce que d'un à quatre allèles distincts peuvent être présents dans chaque locus, c'est-à-dire. l'endroit dans le génome associé à la résistance. Pour ces plantes, il est nécessaire d'obtenir des lignées F1 dont les parents sont connus comme sensibles (S) ou résistants (R) : ♀ (S) + ♂ (R) et ♀ (R) + ♂ (S).

Chaque combinaison génétique doit être réalisée deux fois avec différents individus d'AMATU, ce qui impliquait une réplication complète de l'expérience. Puisqu'il était impossible de déterminer si une plante est sensible à plus d'un herbicide, des populations séparées devaient être préparées pour tester la résistance aux herbicides des groupes 5 et 27. Des individus issus des populations F1 pour chaque groupe d'herbicides devaient ensuite être testés avec les herbicides correspondants pour déterminer s'il s'agissait d'individus R ou S.

### **3. Cartographie génétique et identification de régions génomiques associées à la résistance de l'AMATU aux herbicides des groupes 5 et 27 à l'aide du génotypage par séquençage (GBS)**

La cartographie génétique impliquait la préparation de bibliothèques ddRADSeq (*double digest Restriction-site associated DNA sequencing*) pour le génotypage par séquençage (GBS). Les bibliothèques de séquençage étaient préparées selon la méthode de Peterson et coll. (2012) et les bibliothèques étaient séquencées sur la plateforme Illumina HiSeq 2000. Les indices générés permettaient d'attribuer les séquences obtenues aux individus de la population caractérisée pour la résistance aux herbicides. La séquence du génome d'AMATU, disponible depuis 2020 (Montgomery et coll. 2020), est utilisée pour l'alignement des séquences et l'identification des polymorphismes. Les alignements de séquences sont réalisés à l'aide de logiciels comme BWA, Samtools, bcftools et vcf2gwas.

#### **4. Analyse de l'expression différentielle des gènes associés à la résistance de l'AMATU aux herbicides des groupes 5 et 27 par séquençage d'ARN**

Pour les travaux de transcriptomique, la première étape consistait à identifier des individus issus des différentes populations connues comme étant R ou S aux herbicides des groupes 5 (atrazine) et 27 (mésotrione). Afin d'assurer le suivi d'individus uniques pour les analyses de l'expression différentielle des gènes, il fallait d'abord produire des individus puis les multiplier par bouturage (propagation végétative) pour les caractériser via la méthode du test classique. Les plantes originales étaient bouturées une deuxième fois afin de réaliser une asperersion aux herbicides (comme pour le test classique) et de récolter des échantillons avant et 24 h après traitement herbicide. L'ARN total était ensuite extrait des jeunes feuilles (avant et 24 h après le traitement herbicide) à l'aide du kit commercial RNeasy. Les bibliothèques pour séquençage étaient préparées à l'aide de kits Illumina (TrueSeq Stranded mRNA) puis séquencées par la technologie Illumina.

L'annotation fonctionnelle des marqueurs génétiques potentiels de la résistance de l'AMATU aux herbicides s'est basée sur la similarité des séquences protéiques générées, comparées aux séquences des protéines répertoriées dans les banques de données. Les gènes candidats, exprimés de façon différentielle, étaient mis en évidence et caractérisés par analyse transcriptomique (RNASeq). Ils étaient ensuite alignés sur notre carte physique de l'AMATU pour déterminer s'ils se trouvent dans les *loci* identifiés par cartographie génétique.

#### **5. Détermination des polymorphismes étroitement liés aux gènes responsables de la résistance aux herbicides**

La réalisation des objectifs 2 à 4 nous a permis d'identifier des polymorphismes potentiellement liés à la résistance aux herbicides chez l'AMATU, aussi bien pour le groupe 5 que pour le groupe 27. Afin de tester la robustesse de ces marqueurs potentiels et pour sélectionner les plus robustes d'entre eux, nous avons criblé un panel d'AMATU avec ces marqueurs. Des collections d'AMATU du Québec ont été utilisées pour choisir les marqueurs nous permettant d'établir un diagnostic précis de la résistance.

### **RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS**

#### **1. Développement d'un test génétique pour la résistance aux herbicides du groupe 14 à partir des informations disponibles dans la littérature**

Une paire d'amorces (PPX2LR-F et PPX2LR-R) a été élaborée afin de détecter la délétion  $\Delta G210$  chez les plantes résistantes aux herbicides du groupe 14. Le protocole a été mis au point au laboratoire du Dr. Martin Laforest (AAC) en 2019 et transféré au LEDP-MAPAQ le 18 juin 2019 (voir **Annexe 1A**). Une validation de la méthode par séquençage a été faite par M. David Miville au LEPD. Cette validation a aussi permis d'identifier d'autres polymorphismes. Le séquençage a pu déterminer que ces polymorphismes se situaient dans des introns et n'influençaient pas les conclusions du test génétique. Depuis le transfert du test au LEPD, 114 échantillons ont été testés (source D. Miville, LEDP). Une amélioration notable qui a été apportée est d'avoir un contrôle interne de l'amplification. Ainsi, s'il n'y a aucun fragment observé c'est que l'essai n'a pas fonctionné. Ceci améliore la robustesse de ce test génétique.

## **2. Production des populations F1 d'AMATU et leur caractérisation comme résistantes ou sensibles aux groupes d'herbicides 5 et 27 via la méthode classique**

### **2.1 Obtention des populations R et S**

Depuis le début du projet, nous avons établi des contacts avec des chercheurs des États-Unis et du Canada<sup>1</sup> afin d'obtenir des populations connues pour être S ou R aux herbicides des groupes 5 et 27. Des échantillons d'AMATU provenant du Québec ont été obtenus via le *Service de détection de la résistance aux herbicides* (SDD).

Pour les échantillons provenant des États-Unis, un permis d'importation émis par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) a dû être obtenu au préalable. Afin de respecter les consignes des permis d'importation, des protocoles de biosécurité pour l'entreposage, la manipulation du matériel végétal et la gestion sécuritaire des déchets ont été élaborés et adoptés (voir **Annexe 2**).

### **2.2 Travaux préliminaires : avancement des connaissances sur la biologie et la reproduction de l'amarante tuberculée.**

Différentes méthodes ont été testées pour briser la dormance des graines d'AMATU. De façon générale, nous avons observé que la méthode la plus efficace dépendait de la population source et de l'âge des graines. La méthode donnant les résultats les plus stables et adoptée ensuite pour le projet et pour le SDD, était la stratification de six semaines à 4 °C.

Sous nos conditions, l'AMATU a démontré un potentiel élevé pour la reproduction végétative, incluant la capacité de produire des fleurs et des graines viables à partir des boutures d'une longueur de moins de 2 cm ainsi que la capacité de survivre dans des sacs de plastique sans eau ni lumière pour plus d'un mois. Cette observation inattendue a eu des implications en matière de biosécurité dans le cadre de ce projet, ainsi que des implications pratiques pour un contrôle efficace de l'AMATU au champ. Les protocoles de biosécurité (**Annexe 2**) répondaient aux besoins du projet, puis un projet sur la lutte intégrée de l'AMATU a dédié un volet à la gestion des déchets végétaux de l'AMATU<sup>2</sup>.

### **2.3 Profil de résistance des populations d'AMATU**

Nous avons obtenu les profils de résistance (groupes 5, 27 et 5+27) pour un total de 15 populations. Les résultats obtenus pour les tests de résistance à l'atrazine ont été présentés à la 74<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société canadienne de malherbologie, en novembre 2020, sous la forme d'une affiche (**Annexe 3**).

Suite aux tests de résistance, seules des populations d'AMATU du Québec ont été retenues pour la suite des travaux, puisqu'elles ne montraient pas de différences significatives comparées aux témoins S et R obtenus des É.-U. ou de l'Ontario. Plus spécifiquement, les populations retenues pour le projet ont été les suivantes :

---

<sup>1</sup> Dr Muthukumar Bagavathiannan (Université du Texas A&M), Dr Alan Hager (Université de l'Illinois), Dr Peter Sikkema et du Dr François Tardif (Université de Guelph).

<sup>2</sup> Flores-Mejia, S., Bipfubusa, M.; Fréchette, I.; Mathieu, S.; Faucher, Y.; Duval, B.; Marcoux, A.; Miville, D.; Leblanc, M.; Dupuis, M. « Développement de diverses stratégies de lutte contre l'amarante tuberculée en vue de réduire l'usage d'herbicides ». Prime-Vert sous-volet 3.1 No. 20-008-CEROM. 2020-2023.

- Atrazine : 710 (S) et 721 (R)
- Méso-trione : 715 (S) et 017 (R)

Pour chaque population sélectionnée, nous avons identifié les deux mâles et deux femelles les plus résistants et les plus sensibles, pour un total de huit individus par population. Ces individus ont été utilisés comme « plantes mères » pour la production des populations F1 (**Tableau 1**). Des croisements ont été réalisés dans des cages de pollinisation faites sur mesure, avec des ouvertures de grille plus petites que la taille moyenne du pollen de l'AMATU (18,58 µm).

**Tableau 1.** Croisements des populations choisies pour l'obtention des populations F1

Croisements (Matière active x sexe x profil de résistance)	Femelles (population et individu)	Mâles (population et individu)	Profil de résistance
Méso F-S X Méso M-R	715-F-10	017-M-3	Population plus résistante que le témoin résistant
Méso F-R X Méso M-S	017-F-4	715-M7	Population plus sensible que le témoin sensible
Atra F-S X Atra M-R	710-F-4	721-M-3	Population plus résistante que le témoin sensible, mais pas autant que le témoin résistant
Atra F-R X Atra M-S	721-F-4	710-M-13	Population plus sensible que le témoin sensible

L'obtention des populations F1 et l'obtention de leur profil de résistance (**Tableau 1**) suggèrent une possible coségrégation entre le sexe et un ou plusieurs gènes conférant la résistance. Cet état de fait a eu un effet négatif sur l'avancement des travaux, particulièrement pour le volet méso-trione (voir point 3).

### **3. Cartographie génétique et identification de régions génomiques associées à la résistance de l'AMATU aux herbicides des groupes 5 et 27 à l'aide du génotypage par séquençage (GBS)**

Pour l'atrazine (groupe 5), il existe 2 types de résistance aux herbicides : les inhibiteurs du photosystème II liés à la cible et ceux non liés à la cible. Un test génétique est disponible et validé pour le mécanisme lié à la cible. Un test génétique basé sur l'expression différentielle du gène *AtuGSTF2* est validé et disponible, mais requiert des tissus frais pour produire des résultats de qualité. Des marqueurs génétiques basés sur l'ADN, plus stable, ont été développés dans le cadre du projet et sont en cours de validation.

Pour la méso-trione (groupe 27), il était prévu au départ d'utiliser les populations F1 générées à l'objectif 2, en particulier des populations F1 dont la femelle était résistante (FR x MS) aux herbicides (atrazine ou méso-trione), afin de réaliser des travaux de la cartographie génétique. Suite à l'obtention du profil de résistance des populations F1, nous avons toutefois observé que les populations F1 (FR x MS) n'incluaient pas d'individus résistants aux herbicides testés (0 % de survie à 1 et 2 fois la dose, 6 semaines après l'application de l'herbicide). Aussi, seuls trois individus testés à la méso-trione ont survécu au traitement dans le cas des populations F1, dont le mâle était le résistant (FS X MR).

Pour ces raisons, la cartographie génétique et l'identification de régions génomiques associées à la résistance d'AMATU aux herbicides du groupe 27 ont été réalisées avec des individus issus de la population identifiée à l'origine comme résistante à la mésotrione, plutôt que sur des individus F1. Les populations 714 et 017 ont donc été sélectionnées, un profil de résistance de ~800 individus par population a été obtenu et les individus les plus résistants et les plus sensibles ont été utilisés pour la suite du projet.

Une analyse de type GWAS réalisé sur la population 714 a été réalisé sur un total de 152 individus (67 sensibles et 85 résistantes à la mésotrione). Deux analyses ont été réalisées : une avec le modèle BLINK (*Bayesian information Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway*) et l'autre avec le modèle MLMM (*Multiple Loci Mixed Model*) en utilisant le logiciel GAPIT. Sept SNP ont été identifiés comme étant associées à la résistance à la mésotrione pour la population 714 (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Liste de SNPs associés avec la résistance à la mésotrione pour l'amarante tuberculée (population 714).

Chromosome	Position	P-value	Variance du phénotype*	Annotation
<b>Analyse BLINK</b>				
5	16,253,290	2.97E-08	2.2%	Galactokinase
9	22,098,706	1.70E-08	2.3%	Octopus-like protein
13	21,037,430	1.90E-59	85%	Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein
14	25,693,063	3.41E-09	3.8%	Memo-like protein
<b>Analyse MLMM</b>				
12	4,941,960	1.45E-07	11.6%	Chloramphenicol acetyltransferase- like domain superfamily
13	11,306,035	4.09E-10	17.0%	Nucleic acid-binding, OB-fold
13	21,037,430	2.58E-78	66.7%	Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein

\* Phenotype Variance Explained

Le SNP sur le chromosome 13 est fortement associé à la résistance dans cette population, ayant la valeur p la plus faible ( $1.90 \times 10^{-59}$  et  $2.58 \times 10^{-78}$  pour les analyses BLINK et MLMM, respectivement). Il se trouve dans le dernier intron d'un gène annoté comme « *Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein* ». Cette famille de gènes est impliquée dans le transport de xénobiotiques (antiport H<sup>+</sup>) de type « multidrug transporters ». Ainsi, cet SNP est un candidat important pour le développement d'un test génétique pour le diagnostic de la résistance à la mésotrione.

La séquence du SNP du chromosome 13 (**Annexe 8**) a été partagé au LEDP via Mme Annie Marcoux en janvier 2025. La validation des résultats est en cours (période janvier-avril 2025), en utilisant des plantes d'AMATU qu'ont été envoyés au LEDP/CÉROM par le Service de détection de la résistance pour être testées à la mésotrione par le test classique. Des feuilles des plantules de chaque population testée ont été prélevées avant la pulvérisation de l'herbicide et seront envoyées au LEDP et à AAC pour être testées. Les résultats seront comparés aux résultats du diagnostic obtenu par le test classique.

#### **4. Analyse de l'expression différentielle des gènes associés à la résistance de l'AMATU aux herbicides des groupes 5 et 27 par séquençage d'ARN**

Ce quatrième volet du projet faisait l'objet des études de maîtrise de Geneviève Gagnon, à l'Université Laval, sous la supervision des Drs Dominique Michaud (U. Laval) et Martin Laforest (AAC). La mémoire de maîtrise de Mme Gagnon, est présenté à l'**Annexe 4**.

En bref, nos résultats suggèrent que la forme de résistance suspectée pour les deux matières actives ne serait pas liée au site d'action mais plutôt à une activation du métabolisme oxydatif attribuable à l'activité accrue de certaines familles d'enzymes. Les analyses transcriptomiques ont permis de constater que les individus résistants aux deux herbicides ne montraient pas la réponse de protection typique souvent observée chez les plantes en conditions de stress, où la mise en place de mécanismes de protection est favorisée aux dépens du métabolisme primaire lié à la croissance. Au contraire, les mécanismes de résistance éventuellement impliqués se sont avérés variables, voire imprévisibles chez les individus résistants aux deux composés, suggérant des mécanismes de résistance plus spécifiques dans la plante et, par conséquent, une probabilité plus grande d'identifier des marqueurs de résistance utiles pour la mise au point de tests diagnostiques.

Une analyse détaillée des données transcriptomiques laisse supposer l'implication de gènes spécifiques chez les clones résistants, dont le taux d'expression accru aurait pu prévenir l'effet délétère des herbicides testés. Plusieurs gènes possiblement associés à l'inactivation métabolique de ces composés se sont avérés surexprimés chez les individus résistants, de manière constitutive ou en réponse à l'un ou l'autre des deux herbicides (**Tableau 3**). Des gènes de cytochromes P450 et de peroxydases présumément impliqués dans la **phase I** du processus de détoxification des composés xénobiotiques ont montré par exemple une expression accrue chez les clones résistants. Des gènes de glutathion-S-transférases et de glycosyltransférases possiblement impliquées dans la **phase II** du même processus ont aussi montré des taux de transcrits plus élevés chez ces individus, tout comme les gènes de transporteurs membranaires impliqués dans la **phase III**.

Dans le cas de l'atrazine, l'activation du métabolisme de stress serait imputable à une intensification de l'activité des glutathion-S-transférases (Ma et coll., 2013) et le gène *AtuGSTF2* a déjà été ciblé comme étant responsable de cette résistance (Evans et coll., 2017). En particulier, un gène de glutathion-S-transférase, identifié antérieurement comme gène marqueur potentiel pour une population d'AMATU originaire d'Illinois, le gène *AtuGSTF2* (Evans et coll. 2017), correspond au gène At.05g111120 surexprimé ici de manière constitutive chez les clones résistants à l'atrazine. La conjugaison rapide d'une molécule de glutathion à l'atrazine par l'action des glutathion-S-transférases pourrait ainsi avoir procuré un avantage sélectif aux biotypes résistants, tel qu'illustré dans le cas présent par la résistance de deux populations d'AMATU éloignées l'une de l'autre sur le plan géographique.

En ce qui concerne la mésotrione, la résistance serait attribuable à l'augmentation de l'activité des cytochromes P450 bien qu'aucun gène spécifique n'ait encore été identifié (Ma et coll., 2013 ; Oliveira et coll. 2018). La résistance à cet herbicide serait dans ces différents cas multigénique, tel que suggéré par une étude rapportant des mutations dans plusieurs gènes de cytochromes P450 au sein d'une population résistante répertoriée au Nebraska (Oliveira et coll., 2017). Un scénario similaire pourrait expliquer la résistance de nos clones résistants à la mésotrione, chez qui les gènes de trois de ces enzymes de détoxification



étaient exprimés de façon préférentielle (**Tableau 3**). Ces résultats forts encourageants doivent cependant être validés. Il est important de noter qu'il s'agit de gènes candidats et que notre étude doit être approfondie avant de formuler des conclusions plus définitives. Parmi les gènes exprimés de façon différentielle, il est intéressant de noter la présence d'un gène impliqué dans la réponse au stress oxydatif (NADH déshydrogénase [ubiquinone] subcomplexe; At.02g071680) et dont la protéine se trouve dans le complexe respiratoire 1 des mitochondries.

**Tableau 3.** Gènes surexprimés chez les clones d'AMATU résistants, en lien avec les phases I, II et III du processus de détoxification des xénobiotiques – Données adaptées des Tableaux 3.3–3.6, Section 3.5 de Gagnon 2023.

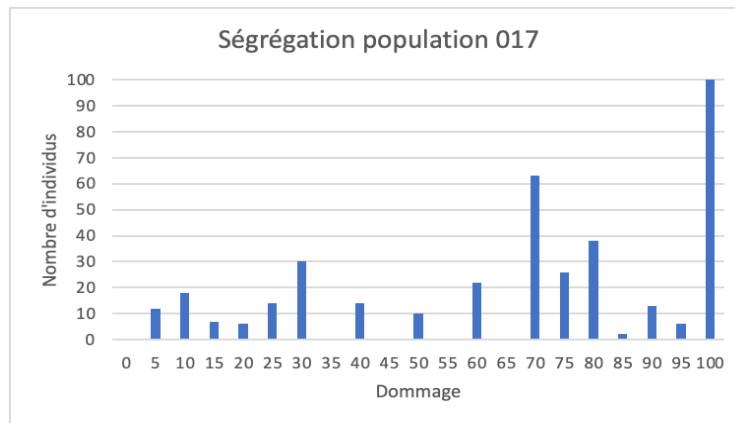
Herbicide cible	Phase de détoxification	Classe protéique	Numéro d'accension
<i>Atrazine</i>	I	Cytochrome P450	At.03g174590
			At.02g132860
			At.05g207520
	II	Glutathion-S-transférase	At.05g111120
		Glycosyltransférase	At.01g012220
	III	Transporteur ABC	At.03g083680
		Transporteur POT	At.02g067810
			At.02g067800
<i>Mésotrione</i>	I	Cytochrome P450	At.00g045450
			At.02g067460
			At.00g045440
		Peroxydase	At.04g189840
			At.03g080440
	II	Glycosyltransférase	At.06g130670
			At.06g130680
	III	Transporteur ABC	At.07g249050
		Transporteur POT	At.02g138380

##### **5. Détermination des polymorphismes étroitement liés aux gènes responsables de la résistance aux herbicides**

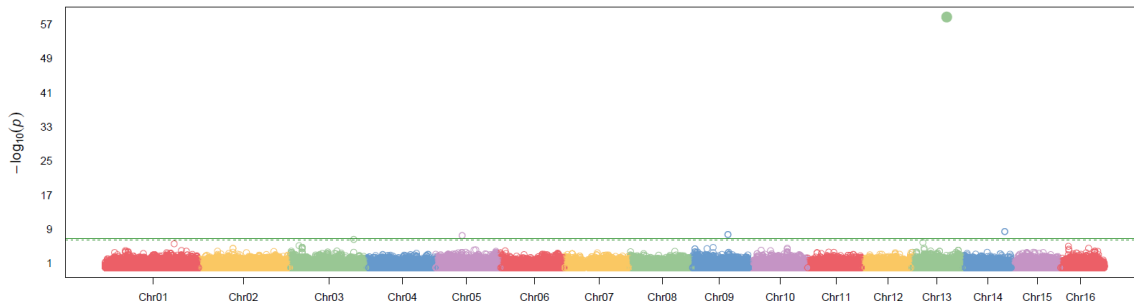
Des individus de la population résistante à la mésotrione (017) ont été criblés à l'aide de l'herbicide et classés selon le niveau de dommages observés (**Figure 1**). Les 87 individus les plus résistants (12 + 18 + 7 + 6 + 14 + 30; dommages de 5% à 30%) ainsi que 297 individus montrant des dommages de 100% (correspondant aux individus les plus sensibles à la mésotrione) ont été sélectionnés pour le séquençage GBS. L'ADN génomique a été extrait et envoyé à l'IBIS pour la préparation des librairies et le séquençage.

Les séquences obtenues ont été démultiplexées, filtrées, rognées selon leur qualité et alignées sur le génome de l'amarante tuberculée (<https://genomevolution.org/>; genome 56678). Par la suite les polymorphismes ont été identifiés et le logiciel vcf2gwas (Vogt, F., et coll. 2022) utilisé pour calculer les associations possibles entre les polymorphismes et le phénotype de résistance à l'herbicide mésotrione. L'analyse des données avec un modèle linéaire (**Figure 2**) a révélé une association avec 2 SNP, une première sur le chromosome 10 et l'autre sur le chromosome 13. Le premier polymorphisme se trouve dans un gène codant pour une « NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2 », une enzyme impliquée dans le complexe respiratoire 1 des mitochondries a été identifiée aussi par les analyses d'expression génique. Le deuxième polymorphisme est associé à une protéine de type « NPGR2 », qui pourrait être également impliqué dans la résistance au stress oxydatif.

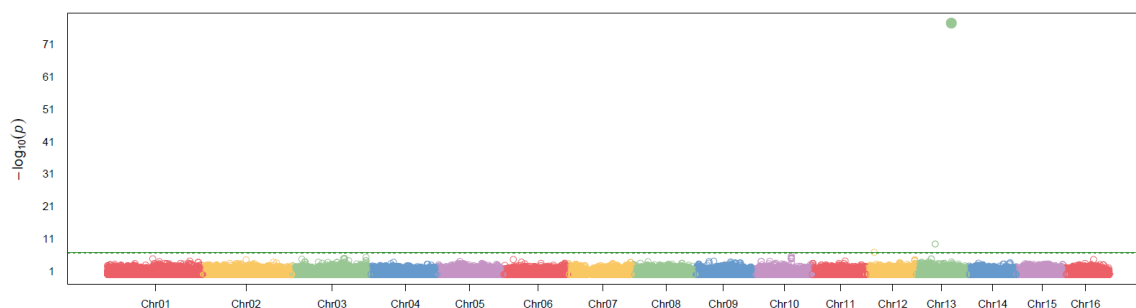
L'analyse avec un modèle linéaire mixte n'a révélé quant à elle que la présence d'une association avec le polymorphisme du chromosome 10 (**Figure 3**). Les résultats de cette cartographie ont été discuté au point 3.



**Figure 1.** Évaluation des dommages observés pour les individus traités à la mésotrione à raison de 2 fois la dose indiquée sur l'étiquette du produit. **N.B.:** Chaque catégorie représente le niveau de dommages observés et le nombre d'individus dans chacune des catégories est illustré.



**Figure 2.** Analyse de type GWAS avec le modèle BLINK (*Bayesian information Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway*) pour les associations entre le phénotype de résistance et les polymorphismes trouvés dans la population 017. L'axe des X représente les différents chromosomes de l'amarante tuberculée et l'axe des Y la p-value ( $-\log_{10}(P)$ ) pour l'association entre le marqueur et le phénotype. La ligne horizontale verte pointillée correspond au seuil significatif à 0.05 et la ligne horizontale verte continue correspond au seuil significatif corrigé par la méthode Bonferroni.



**Figure 3.** Analyse de type GWAS avec le modèle *Multi Locus Linear Model* pour les associations entre le phénotype de résistance et les polymorphismes trouvés dans la population 017. L'axe de X représente les différents chromosomes de l'amarante tuberculée et l'axe des Y la p-value ( $-\log_{10}(P)$ ) pour l'association entre le marqueur et le phénotype. La ligne horizontale verte pointillée correspond au seuil significatif à 0.05 et la ligne horizontale verte continue correspond au seuil significatif corrigé par la méthode Bonferroni.

## DIFFUSION DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus lors des tests de résistance de la population 589 ont été présentés à la 74<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société canadienne de malherbologie, en novembre 2020, sous la forme d'une affiche (**Annexe 3**).

Mme Geneviève Gagnon a réalisé deux présentations en lien avec les résultats de sa maîtrise : une présentation au Midi-Science du CÉROM le 20 janvier 2021 (**Annexe 5**) et un séminaire de mémoire de maîtrise le 23 mars 2022 (**Annexe 6**).

Une présentation de Dr. Laforest a eu lieu à l'édition 2024 de la Société de protection des plantes du Québec (SPPQ), qui aura lieu à Québec (Wendake) les 6 et 7 juin 2024. Le titre de la présentation sera : « Développement des méthodes de détection moléculaire de la résistance aux herbicides des groupes 5, 14 et 27 pour l'amarante tuberculée ». Les résultats du projet seront également présentés dans un article scientifique.

Une présentation de Dr. Laforest (« Set up of genetic marker tests to detect and manage herbicide resistant weeds ») a eu lieu à la réunion jointe de la Société Canadienne de malherbologie (CWSS) et la Weed Science Society of America (WSSA) à Vancouver, BC en février 2025.

## ACTIVITÉS DE DIFFUSION ET TRANSFERT AUX UTILISATEURS

Trois tests diagnostiques ont été transférés au LEDP :

1. Pour détecter la présence de la délétion  $\Delta G210$  chez les plantes résistantes aux herbicides du groupe 14. Protocole transféré au LEDP-MAPAQ le 18 juin 2019 (Annexe 1).
2. Pour détecter l'expression différentielle du gène *AtuGSTF2* pour la caractérisation des plantes d'amarante tuberculée résistante à l'atrazine (groupe 5). Envoyé au LEDP le 30 novembre 2023. (Annexe 7).

3. Pour détecter des SNP associés à la résistance du mésotrione (groupe 27). Envoyé au LEDP en janvier 2025 (Annexe 8).

Depuis 2020, 114 tests de détection de la résistance au groupe 14 (délétion  $\Delta G210$ ) ont été réalisés par le LEDP (D. Miville, *comm. pers.* 2024).

## POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Sandra Flores-Mejia, PhD.  
Centre de recherche sur les grains inc. (CÉROM)  
740 chemin Trudeau  
Saint Mathieu de Belœil, J3G 0E2  
Tel : +1 (450) 464 - 2715 poste 219,  
Courriel : [sandra.flores-mejia@cerom.qc.ca](mailto:sandra.flores-mejia@cerom.qc.ca)

## REMERCIEMENTS

Les collaborateurs du projet remercient les chercheurs qui ont partagé gracieusement des populations d'amarante tuberculée : le Dr. Muthukumar Bagavathiannan (Université du Texas A&M), le Dr. Aaron Hager (Université de l'Illinois), le Dr. Peter Sikkema et le Dr. François Tardif (Université de Guelph). Des remerciements sont également faits aux étudiants et stagiaires, ainsi qu'au personnel des différentes institutions impliquées, qui ont contribué à la réalisation du projet : Patrice Hamelin, Samara Driessen, Éric Fortier, Félix-Antoine RoyEddy Michaud et Olivier Pageau (CÉROM), Marianne Bessette et Brahim Soufiane (AAC) et Marie-Claire Goulet (Université Laval).

Ce projet a été réalisé dans le cadre du volet 2 du programme Prime-Vert – Approche régionale et interrégionale avec une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

## ANNEXES

(Présentées en pièce jointe).

- **Annexe 1.** Protocole du test moléculaire pour détecter la résistance au groupe 14 chez AMATU, transféré au LEDP-MAPAQ en juin 2019.
- **Annexe 2.** Protocole de biosécurité pour la gestion de l'amarante tuberculée dans un contexte de recherche
- **Annexe 3.** Gagnon et coll. 2020. Responses to atrazine in male and female plants of common waterhemp (*Amathus tuberculatus*). 74<sup>th</sup> Annual meeting of the Canadian Weed Science Society. (Virtual reunion). November 2020.
- **Annexe 4.** G. Gagnon. 2023. Caractérisation transcriptomique sommaire de clones de l'amarante tuberculée (*Amaranthus tuberculatus*) résistants à l'atrazine ou à la mésotrione. Maîtrise en biologie végétale. Mémoire. Document no. 38788. Université Laval. <http://hdl.handle.net/20.500.11794/116163>
- **Annexe 5.** Présentation au Midi-Science.
  - A. Invitation au Midi-Science.

- B. G. Gagnon. 2023. Caractérisation transcriptomique des mécanismes de résistance à l'atrazine et à la mésotrione chez l'amarante tuberculée (*Amaranthus tuberculatus*). 21 janvier 2021.
- **Annexe 6.** G. Gagnon. 2023. Caractérisation transcriptomique sommaire de clones de l'amarante tuberculée (*Amaranthus tuberculatus*) résistants à l'atrazine ou à la mésotrione. Séminaire de mémoire de maîtrise. Résumé. 23 mars 2022.
- **Annexe 7.** Test pour détecter l'expression différentielle du gène *AtuGSTF2* la caractérisation des plantes d'amarante tuberculée résistante à l'atrazine (groupe 5).
- **Annexe 8.** Analyse d'association pan-génomique de la résistance à la mésotrione de l'amarante tuberculée (population 714) et séquences contextes du SNP associé à la résistance à la mésotrione chez l'amarante tuberculée (population 714).

## RÉFÉRENCES

- Evans, A. F. et coll. (2017).** Biochemical characterization of metabolism-based atrazine resistance in *Amaranthus tuberculatus* and identification of an expressed GST associated with resistance - Evans - 2017 - Plant Biotechnology Journal - Wiley Online Library. Plant Biotechnology Journal, 15(10), 1238–1249.
- Franssen, A.S. et coll. (2001).** Pollen morphological differences in *Amaranthus* species and interspecific hybrids. Weed Science. 49(6): p. 732-737.
- Ma, R., et coll. (2013).** « Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. » Plant physiology 163: 363-377.
- Montgomery J.S. et coll. (2020).** Draft Genomes of *Amaranthus tuberculatus*, *Amaranthus hybridus*, and *Amaranthus palmeri*. Genome Biology and Evolution. 12 (11): p. 1988-1993.
- Oliveira et al. (2017)** Confirmation and Control of HPPD-Inhibiting Herbicide-Resistant Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) in Nebraska. *Weed Technology*, 31(1), 67-79.
- Oliveira, M. C. et coll. (2018).** Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. Pest Management Science, 74(10), 2296–2305.
- Patzoldt, W.L. et coll. (2006).** A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS). 103: p. 12329-12334.
- Peterson, B.K. et coll. (2012).** Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS One. 7(5): p. e37135.
- Vogt, F., et coll. (2022).** *vcf2gwas*: Python API for comprehensive GWAS analysis using GEMMA. Bioinformatics, 38 (3), p. 839–840.