

FICHE SYNTHÈSE

Volet 2 – Approche régionale et interrégionale

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

ORGANISME Centre de recherche sur les grains inc. (CÉROM), Agriculture et agroalimentaire Canada (AAC), Université Laval, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), Laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection (LEDP).

AUTEURS Sandra Flores-Mejia, Martin Laforest et Dominique Michaud.

COLLABORATEURS

Geneviève Gagnon, Marie Bipubusa, Stéphanie Mathieu, Annie Marcoux, Firmo Sousa et Gabriel Verret.

INTRODUCTION

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, toutes les populations identifiées à ce jour 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.

OBJECTIFS

Objectif général : Développer des méthodes moléculaires permettant de détecter rapidement la résistance aux groupes 5, 14 et 27 chez l'AMATU.
Objectifs spécifiques : **1)** Développement d'un test génétique pour la résistance aux herbicides du groupe 14 à partir des informations disponibles dans la littérature. **2)** Production des populations F1 d'AMATU et leur caractérisation comme résistantes ou sensibles aux groupes 5 et 27 via la méthode classique. **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). **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. **5)** Détermination des polymorphismes étroitement liés aux gènes responsables de la résistance aux herbicides.

MÉTHODOLOGIE

Objectif 1 : Développer une méthode pour détecter le gène PPX2L par amplification PCR à l'aide de deux paires d'amorces spécifiques. **Objectif 2 :** Il a fallu déterminer le profil de résistance aux groupes 5 (atrazine) et 27 (mésotrione) de plusieurs populations d'AMATU issues des différentes localités (États-Unis, Ontario et Québec). Les deux populations les plus sensibles (S) et les plus résistantes (R) ont été choisies pour réaliser des croisements pour obtenir des lignées F1 dont les parents (plantes mères) sont connus comme S ou R : ♀ (S) + ♂ (R) et ♀ (R) + ♂ (S). Des cages de pollinisation faites sur mesure ont été utilisées puis des protocoles de biosécurité ont été développés pour ce volet. Les différents individus obtenus ont été utilisés pour réaliser les travaux des objectifs 3 à 5. **Objectif 3 :** La cartographie génétique impliquait la préparation de librairies ddRADSeq (double digest Restriction-site associated DNA sequencing) pour le génotypage par séquençage (GBS). Les librairies de séquençage étaient préparées selon la méthode de Peterson et coll. (2012) et les librairies 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. **Objectif 4 :** Il a fallu d'abord produire des individus (plantes mères) appartenant aux populations choisies (objectif 2) puis les multiplier par bouturage (propagation végétative) pour les caractériser via la méthode du test classique. Des échantillons ont été récoltés 24 h avant et après traitement herbicide. L'ARN total était ensuite extrait des jeunes feuilles à l'aide du kit commercial RNeasy. Les librairies 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 dans la résistance de l'AMATU 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). **Objectif 5 :** Les individus les plus sensibles et les plus résistantes 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. Par la suite les polymorphismes ont été identifiés et le logiciel vcf2gwas utilisé pour calculer les associations possibles entre les polymorphismes et le phénotype de résistance à l'herbicide mésotrione.

RÉSULTATS

Objectif 1 : 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. **Objectif 2 :** Différentes méthodes ont été testées pour briser la dormance des graines d'AMATU. Nous avons obtenu les profils de résistance pour un total de 15 populations (Photo 1). Les populations retenues pour le projet ont été les suivantes : atrazine : 710 (S) et 721 (R) et mésotrione : 715 (S) et 017 (R), puis des populations F1 ont été créées et leur profil de résistance a été obtenu. Néanmoins, les résultats suggèrent une possible coségrégation entre le sexe et un ou plusieurs gènes conférant la résistance. **Objectif 3 :** Pour l'atrazine, 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. Concernant la mésotrione, une analyse de type GWAS (Genome Wide Association Study) a permis d'identifier un SNP très fortement associé à la résistance à la mésotrione. Le gène situé à proximité de ce SNP est annoté comme étant une « Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein », une famille de protéines pouvant être impliquée dans le transport des xénobiotiques comme la mésotrione. Nous faisons actuellement des recherches plus approfondies sur le sujet, mais ces résultats constituerait une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de résistance aux herbicides. **Objectif 4 :** Les résultats suggèrent que la forme de résistance suspectée pour les deux matières actives serait liée à une activation du métabolisme oxydatif attribuable à l'activité accrue de certaines familles d'enzymes. Dans le cas de l'atrazine, l'activation du métabolisme de stress serait imputable à une intensification de l'activité des glutathion-S-transférases et le gène AtUGSTF2 (At.05g111120 dans le Tableau 1). En ce qui concerne la mésotrione, la résistance serait attribuable à la séquestration ou au transport de la matière active de sorte qu'elle n'entre pas en contact avec son site d'action. **Objectif 5 :** Notre analyse révélait des associations entre le phénotype de résistance et 6 marqueurs se trouvant sur les chromosomes 5, 9, 12, 13 (2) et 14. Le marqueur se trouvant à la position 21 037 430 sur le chromosome 13 suggère une très fortement associé à la résistance dans la population 714.

TABLEAUX, GRAPHIQUES OU IMAGES



Photo 1. Le projet a permis d'avancer les connaissances sur la biologie de l'amarante tuberculée, incluant la capacité de reproduction végétative. Le profil de résistance, via le test classique, aux groupes 5, 27 et 5+27 pour un total de 15 populations a été obtenu.

Crédit photo : S. Flores-Mejia. Photo gagnant le 2^{ème} place dans la catégorie *Recherche en action* du concours photo de la Société canadienne de malherbologie en 2020.

Tableau 1. Gènes surrexprimés chez les clones d'AMATU résistants, en lien avec les phases I, II et III du processus de détoxicification des xénobiotiques – Données adaptées des Tableaux 3.3–3.6, Section 3.5 de Gagnon 2023.

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

IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Le projet a permis d'avancer les connaissances sur la biologie de l'amarante tuberculée. Cela a permis de : A) identifier la méthode pour briser la dormance des graines d'AMATU. Cette méthode a été adoptée par le *Service de détection de la résistance aux herbicides* (collaboration entre le CÉROM et le LEDP). B) Approfondir les connaissances en lien avec la capacité de reproduction de l'AMATU et ses implications en matière de biosécurité autant dans le cadre de ce projet et des implications pratiques éventuelles au champ. Des protocoles de biosécurité ont été élaborés pour répondre aux besoins du présent projet. Nos observations ont permis de développer un autre projet sur la lutte intégrée de l'AMATU avec un volet à la gestion des déchets végétaux de l'AMATU au champ (Prime-Vert sous-volet 3.1 No. 20-008-CEROM), ayant des retombées directes pour les producteurs.

Deux 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. 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. Depuis 2020, 114 tests de détection de la résistance au groupe 14 (délétion $\Delta G210$) ont été réalisés par le LEDP.

Le projet a permis de former une étudiante à la maîtrise (G. Gagnon, <http://hdl.handle.net/20.500.11794/116163>) et plusieurs étudiants de premier cycle. Les résultats ont été présentés aux conférences à niveau national (Société canadienne de malherbologie), provincial (Midi-Sciences du CÉROM, Société de protection des plantes du Québec, SPPQ).

DÉBUT ET FIN DU PROJET

3 avril 2019/31 août 2024

POUR INFORMATION

Sandra Flores-Mejia, Ph.D.

Chercheure en malherbologie

CÉROM

740, chemin Trudeau

St-Mathieu-de-Beloeil (Québec) J3G 0E2

Tél. : 450 464-2715, poste 219

sandra.flores-mejia@cerom.qc.ca