

# AMÉLIORATION DES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRES DES RAVAGEURS POUR RÉPONDRE AUX BESOINS EN DIAGNOSTIC DU SECTEUR AGRICOLE DANS LE CONTEXTE DES CHANGEMENTS CLIMATIQUES

ALESSANDRO DIENI<sup>1</sup>, FRANZ VANOOSTHUYSE<sup>1</sup>, DANIEL CORMIER<sup>1</sup>, JEAN-PHILIPPE LÉGARÉ<sup>2</sup>, MARIO FRÉCHETTE<sup>2</sup> et ANNABELLE FIRLEJ<sup>1</sup>

1. Institut de recherche et de développement en agroenvironnement / 2. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation

Avec les changements climatiques, bon nombre de ravageurs des cultures seront favorisés. Certains auront plus de générations, d'autres agrandiront leur aire de répartition alors que de nouvelles espèces exotiques s'établiront sur le territoire québécois. Afin que les milieux agricole et scientifique puissent faire face aux changements climatiques, ce projet a pour objectif d'identifier par analyses moléculaires (barcode) les ravageurs présents dans la Collection d'insectes du Québec (CIQ) (Figure 1) et dont les séquences ADN québécoises sont absentes des bases de données publiques comme le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), banque de référence internationale. La technique d'identification par barcode consiste à séquencer l'ADN des spécimens vivants ou morts dans le but de comparer la séquence obtenue à celles déjà présentes dans les banques de référence, facilitant ainsi l'identification taxonomique des ravageurs des cultures.

## OBJECTIFS DU PROJET

L'objectif général du projet était d'améliorer les techniques de dépistage moléculaire pour le secteur agricole afin de faire face aux changements climatiques. Plus spécifiquement, le projet visait :

- à cibler les ravageurs d'intérêt présents dans la CIQ n'ayant pas de barcode d'origine québécoise dans les bases de données publiques;
- à analyser la région barcode des spécimens identifiés afin d'enrichir les bases de données publiques; et
- à valider la technique moléculaire avec des spécimens récoltés sur le terrain.

## MÉTHODOLOGIE

**Objectif 1 : cibler les ravageurs d'intérêt présents dans la CIQ n'ayant pas de barcode d'origine québécoise dans les bases de données publiques**

Le projet a ciblé 25 familles de ravageurs pour lesquelles nous avons procédé à une révision des noms et des synonymes des espèces présentes. Les espèces n'ayant pas de références génétiques en provenance du Québec dans les bases de données publiques, et dont plus de trois spécimens étaient présents dans la collection, ont été sélectionnées. Pour chaque espèce, jusqu'à cinq spécimens de régions distinctes furent sélectionnés et une de leurs pattes fut prélevée pour l'extraction d'ADN (Figure 2, au verso).

**Objectif 2 : analyser la région barcode des spécimens identifiés afin d'enrichir les bases de données publiques**

Plusieurs paires d'amorces ADN ont été testées afin d'augmenter le taux de succès de séquençage des spécimens de la CIQ et trois



Figure 1. Collection d'insectes du Québec (CIQ)

stratégies d'amplification ont été élaborées. Toutes les pattes des spécimens de la CIQ ont été analysées via une stratégie conservatrice d'amplification : « Overlap + Nested PCR » (Figure 3, au verso).

**Objectif 3 : valider la technique moléculaire avec des spécimens récoltés sur le terrain**

Un échantillonnage intensif de spécimens a été réalisé en 2016 sur plusieurs sites afin de ne conserver qu'environ 260 spécimens dont l'ADN a été séquencé via une stratégie d'amplification standard. Les séquences obtenues ont été analysées avec le NCBI et avec la base de données de la CIQ pour vérifier si les barcodes générés par le projet venaient enrichir les bases de données publiques.

## RÉSULTATS

Au total, 572 pattes de spécimens ont été prélevées dans la CIQ afin d'obtenir 313 nouveaux barcodes québécois à intégrer dans le NCBI,

dont plusieurs proviennent d'espèces de vers fil-de-fer (Elateridae) jamais référencés auparavant. De ce nombre, 68 barcodes seront à analyser spécifiquement pour leur potentiel de dépôt dans le NCBI. Un total de 191 spécimens pour lesquels nous n'avons pas été en mesure d'obtenir un barcode de qualité appartiennent aux familles des Miridae (38,5 % de succès), Acrididae (25,0 % de succès), Cicadellidae (18,8 % de succès) et Siricidae (11,8 % de succès).

Un échantillonnage durant l'été 2016 a permis de récolter plus de 1 300 spécimens dans différents secteurs de culture pour réaliser la validation de nos séquences en provenance de la CIQ. De ce nombre, 124 spécimens immatures et 142 spécimens adultes ont été sélectionnés pour la validation (sous-échantillonnage), ce qui a permis d'obtenir 141 séquences de qualité analysable d'environ 648 pb (selon un protocole standard). Nous avons observé, en interrogeant les bases de données du NCBI et de la CIQ avec les séquences de validation, que les résultats d'identification sont très similaires, confirmant ainsi la qualité de nos barcodes. Cependant, la proportion des séquences de validation couvertes par les barcodes de la CIQ lors d'interrogation est généralement faible dans notre cas (moins de 85 %), car nous avons utilisé un protocole générant des séquences de plus petites tailles (559 pb) comparativement à celles qu'on peut obtenir avec un protocole standard (~648 pb). Ainsi, il est important de considérer ce facteur en utilisant les barcodes de la CIQ, car, dans certains programmes d'interrogation de bases de données génétiques, les barcodes de la CIQ pourraient se trouver plus bas dans la liste des résultats même s'ils ont un pourcentage de similarité plus élevé que les barcodes listés plus haut.



Figure 2. Prélèvement des pattes de spécimens de la CIQ

projet est important puisque plusieurs institutions sont maintenant équipées de matériel qui leur permet d'offrir des services de diagnostic moléculaire. Par la mise au point de protocoles adaptés pour des spécimens de collection, les détenteurs de collections d'insectes de référence, notamment le MAPAQ (via la CIQ), peuvent continuer de référencer leurs spécimens, ce qui assure la pérennité et la qualité des identifications d'insectes de collection. De plus, les méthodes développées permettent aux organismes œuvrant dans le domaine du diagnostic entomologique en phytoprotection d'accroître leur offre de service de diagnostic.

## IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Ce projet a permis de rendre disponible la méthodologie détaillée et pertinente pour utiliser l'identification moléculaire par les équipes de recherche qui le désirent selon les besoins reliés à leurs différents projets. Le potentiel d'applicabilité des résultats du

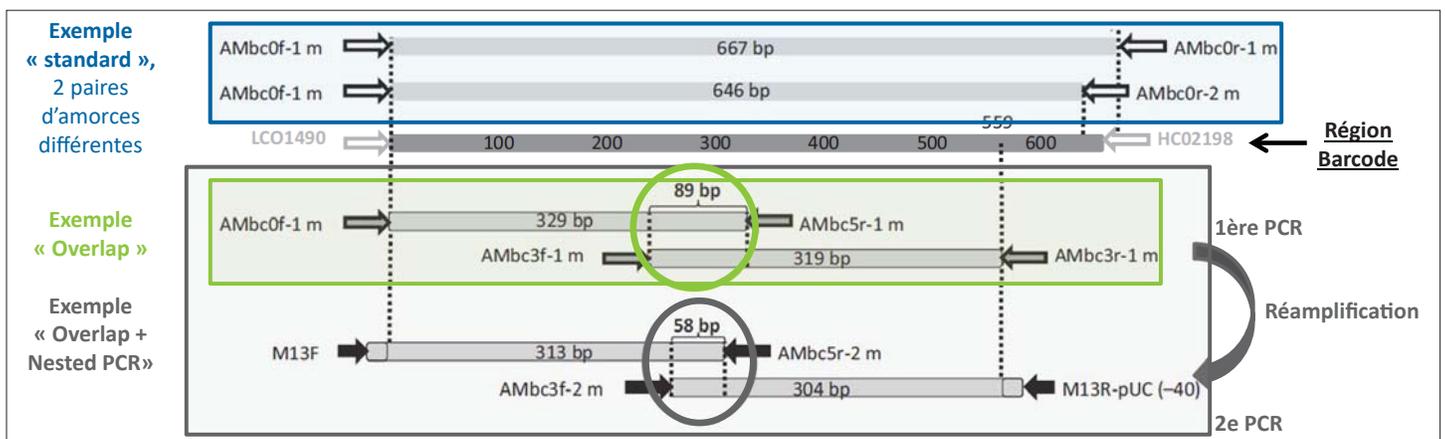


Figure 3. Stratégies d'amplification de l'ADN pour obtenir des barcodes

## PARTENAIRES DE RÉALISATION ET DE FINANCEMENT



Ce projet a été réalisé en vertu du sous-volet 3.2 du programme Prime-Vert 2013-2018 et il a bénéficié d'une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) par l'entremise du Fonds vert.

### POUR EN SAVOIR D'AVANTAGE

Annabelle Firlej, Ph. D.  
 Chercheure en entomologie fruitière  
 450 653-7368, poste 363  
[annabelle.firlej@irda.qc.ca](mailto:annabelle.firlej@irda.qc.ca)