



Caractérisation d'un gène de résistance contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) chez l'épinette blanche (*Picea glauca* (Voss.) Moench).

Mémoire

Gaby Germanos

Maîtrise en sciences forestières

Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Gaby Germanos, 2014

Résumé

Lors d'une épidémie localisée de tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*), certaines épinettes blanches (*Picea glauca* (Voss.) Moench) furent épargnés. L'expression d'un gène, *Pgβglu-1*, codant pour une enzyme de type bêta-glucosidase est liée à la production d'acétophénones s'accumulant dans les aiguilles des arbres peu défoliés. La variation de l'expression de *Pgβglu-1* semble relèver d'une régulation inhérente et unique aux arbres résistants.

Nos résultats permettent d'établir une corrélation entre l'expression du gène, l'accumulation des acétophénones actives et le stade le plus destructif de l'insecte. Ils montrent aussi que le niveau d'expression de *Pgβglu-1* est transmis entre les générations d'arbres et peut être induit. Les séquences d'ADN codants du gène ont été obtenues, mais aucune différence n'a été observée permettant de différencier les résistants des non-résistants.

Une connaissance plus approfondie du phénomène pourrait aider au développement d'une lutte intégrée visant à mitiger les dégâts causés par la tordeuse en période d'épidémie.

Abstract

A localized spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) outbreak that took place in a white spruce plantation (*Picea glauca* (Voss.) Moench) left some trees almost untouched while many others had severe defoliation. Expression of a gene coding for a beta-glucosidase enzyme was identified (*Pgβglu-1*) and was linked to the accumulation of two acetophenones in the foliage of resistant trees. We propose that the expression variation of *Pgβglu-1* involve regulation that is unique to resistant trees.

Our results establish a correlation between gene expression, the accumulation of biologically active acetophenones and the most destructive larval instar of the insect. Our results also show that *Pgβglu-1* expression is genetically transmitted and can be induced. Coding DNA sequences of the gene were obtained but no differences were observed that could differentiate between resistant and non-resistant trees.

A deeper understanding of the phenomenon could help in the development of an integrated management aiming to mitigate damage caused during outbreaks.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Remerciements.....	xiii
Avants-propos	xv
Chapitre 1 – Introduction.....	1
La tordeuse des bourgeons de l'épinette	2
L'épinette blanche.....	5
Les interactions entre plantes et organismes nuisibles.....	7
Survol des mécanismes de défense des plantes.....	8
Le rôle des β -glucosidase dans la défense.....	10
Les composés phénoliques.....	11
Mise en contexte	12
Le gène candidat	13
Hypothèses et objectifs	14
Chapitre 2 – Characterization of a novel resistance phenomenon agaisnt spruce budworm (<i>Choristoneura fumiferana</i>) in white spruce (<i>Picea glauca</i> (Voss.) Moench).....	17
Résumé.....	19
Abstract	21
Introduction	23
Materials and methods	25
Plant material sampling and preparation	25
RNA and DNA extraction and quality control.....	26
cDNA preparation and RT quantitative PCR.....	27
Comparative sequencing and PCR.....	28
Acetophenones extraction and high performance liquid chromatography analysis.....	29

Statistical analyses	30
Results	32
Gene sequencing and structure analyses	32
Heritability and inducibility	34
Seasonal fluctuation	39
Discussion and conclusion.....	42
Genetics and evolutionary implications.....	42
Ecological and physiological implications of acetophenone-based SBW resistance ...	44
Concluding remarks	47
Acknowledgments	48
Chapitre 3 – Conclusions et perspectives.....	49
Analyses complémentaires	50
Perspectives et applications pratiques	53
Littérature citée	55

Liste des figures

Figure 1.1 : Aires de répartition.....	6
Figure 1.2 : Acétophénones impliqués dans la résistance.....	12
Figure 2.1: Comparison of gene structure between <i>Picea glauca</i> 's <i>Pgβglu-1</i> and most similar homologs in <i>Oryza sativa</i> and <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
Figure 2.2: Expression level of the <i>Pgβglu-1</i> gene in trees from R and N-R mothers.....	37
Figure 2.3: Expression level of the <i>Pgβglu-1</i> gene in trees from eight different mothers....	38
Figure 2.4: Temporal variation of <i>Pgβglu-1</i> expression and acetophenones concentration.	41

Liste des tableaux

Table 2.1:Primer sequences used for quantitative PCR analysis and sequencing assays.....	31
Table 2.2: Average fold change of the expression of <i>Pgβglu-1</i> gene for each family pre and post induction time.....	38

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr John Mackay, pour m'avoir permis de réaliser ce projet dans son laboratoire et m'avoir encadré tout au long de mon cheminement. Je voudrais aussi remercier le Dr Éric Bauce pour avoir accepté d'agir comme co-directeur de mon projet et d'avoir mis à ma disposition matériel et expertises complémentaires pour le mener à bien.

Je tiens aussi à remercier les professionnels de recherche, Isabelle Giguère et Sébastien Caron, qui ont grandement participé à ma formation scientifique et m'ont beaucoup aidé tout au long de ma maîtrise que ce soit pour des conseils, des questions techniques, du travail de terrain ou de la révision de textes scientifiques. Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire du Dr John Mackay ainsi qu'André Gagné du CEF pour l'assistance que j'ai reçue lors d'échantillonnages et de préparation de présentations. Un merci spécial à Patrick Lenz et Mébarek Lamara qui ont récolté les semences qui ont été utilisées pour produire les semis de mes expériences. Je n'oublie pas non plus Geneviève Parent pour l'aide précieuse en ce qui concerne l'analyse de mes données ainsi que la finalisation de mon projet.

J'exprime ma reconnaissance envers Martin Charest qui m'a aidé pour tous les échantillonnages sur le terrain, l'expertise sur la tordeuse ainsi que certaines expériences en laboratoire. Je voudrais aussi mentionner les conseils donnés par le Dr Armand Séguin et Denis Lachance pour l'élaboration de protocoles.

Avants-propos

Ce projet a été financé par Génome Québec, Génome Canada, le FQRNT, le CRSNG et réalisé dans le cadre du projet SMarTForests. Il a été exécuté sous la direction du Dr John Mackay et la co-direction du Dr Éric Bauce.

Ce mémoire est séparé en trois chapitres. Le premier est une introduction composée d'une revue de littérature sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette et son hôte principal, l'épinette blanche ainsi que sur différents mécanisme de défense contre les insectes et pathogènes chez les plantes. Une brève mise en contexte du projet est aussi présentée.

Le deuxième chapitre est en anglais et est présenté sous la forme d'un manuscrit scientifique. Il serait en partie transmis à une revue scientifique très prochainement mais non pas dans le format ici présent. Les expériences sur la structure du gène, sur l'héritabilité et l'induction ont été réalisées par l'auteur (Gaby Germanos). La partie sur la fluctuation saisonnière a été réalisée avec l'aide de Martin Charest et Geneviève Parent qui ont élaboré le protocole d'extraction des composés phénoliques et d'analyse par HPLC. Geneviève Parent a aussi exécuté les analyses statistiques pour cette même section. L'obtention des données d'expression et d'acétophénones a été réalisée par l'auteur.

Finalement, le troisième chapitre résume les conclusions du mémoire et propose quelques perspectives de recherche et d'applications pratiques en lien avec la résistance contre la TBE.

Chapitre 1 – Introduction

Durant un épisode de tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) (TBE) qui eut lieu au début des années 2000, certains arbres d'une plantation d'épinettes blanches (*Picea glauca* (Voss.) Moench) affectée furent visiblement épargnés (Daoust & al, 2010). Des études subséquentes sur les arbres concernés et leurs confrères défoliés ont révélé la présence de deux acétophénones, toxiques pour la tordeuse, dans les aiguilles des arbres intacts (Delvas et al, 2010). La découverte de ces arbres résistants encouragea des études approfondies afin de découvrir les bases génétiques ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance et mena à la découverte du gène *Pgβglu-1*. Bien que plusieurs questions soient soulevées suite à cette découverte, certaines ont été jugées primordiales pour la suite des recherches sur ce phénomène et feront donc l'objet de ce mémoire. Premièrement, quelle est la structure du gène *Pgβglu-1* et existe-t-il une différence dans la séquence génomique transcrite entre les arbres ayant un phénotype résistant et les défoliés? Deuxièmement, est-ce que l'expression différentielle observée est génétiquement transmissible à la progéniture ou dépend-elle de l'environnement? Enfin, nous allons évaluer si l'expression du gène concerné est sujette à des variations au cours de la saison et si l'accumulation des acétophénones biologiquement actives est corrélée à l'expression.

Les travaux réalisés vont nous permettre d'approfondir les connaissances par rapport aux questions ciblées. Ces dernières ont été jugées prioritaires car elles touchent trois des facettes les plus importantes pour la possibilité de retombées pratiques.

La tordeuse des bourgeons de l'épinette

Les épidémies d'insectes ravageurs constituent la perturbation qui cause les plus grandes pertes de biomasse forestière au Canada. La tordeuse des bourgeons de l'épinette est considérée comme un des insectes défoliateurs les plus destructifs d'Amérique du Nord et un des organismes les plus nuisibles aux forêts de pins et d'épinettes du continent (Fleming, 2000). Les superficies touchées et la sévérité des épidémies ont augmenté au cours du 20^e siècle (Blais, 1983) et la dernière épidémie majeure, de 1973 à 1987, a causé la perte de près d'un demi-milliard de m³ de bois, en mortalité et réduction de croissance, au Québec seulement. Les superficies touchées par la tordeuse ont augmenté continuellement durant la dernière décennie jusqu'à atteindre plus de 3 millions d'hectare de forêt touchée en 2013, la moitié étant gravement touchée (71 à 100 % de perte des pousses de l'année) (Ministère des ressources naturelles, 2013). Il est donc de plus en plus important de raffiner nos méthodes de lutte contre la tordeuse afin de limiter les dommages causés lors des épidémies et arrêter ou même inverser la tendance croissante en ce qui concerne la sévérité et les étendues affectées.

La TBE est un insecte de l'ordre des Lépidoptères, qui mesure 10 à 12 mm avec une envergure de 21 à 30 mm. Sa distribution ainsi que celle de différentes espèces sont présentées à la figure 1.1 A. Son corps est brun foncé et ses ailes sont grises avec des taches plus foncées, le mâle et la femelle sont pratiquement identiques et aussi nombreux (Kucera et Orr, 1980). L'adulte, ou stade papillon, vit seulement une semaine et la ponte a lieu à peine une journée après l'accouplement. LA TBE passe par six stades larvaires et la grande majorité de la nourriture ingurgitée l'est durant le cinquième et sixième stade (Carisey &

Bauce, 1997). Le 2^{ème} stade larvaire passe l'hiver en diapause dans un hibernaculum et émerge au printemps et commence alors à s'alimenter.

Il existe un contrôle naturel de la TBE exercé par ses différents prédateurs, parasitoïdes et certains pathogènes. Les principaux prédateurs sont des oiseaux alors que les parasitoïdes sont principalement deux espèces de guêpes (*Tranosema rostrale* et *Elachertus cacoeciae*) et une mouche (*Actia interrupta*) (Ressources Naturelles Canada, 2012; Kucera et Orr, 1980). Cependant, en considérant seulement des TBE se nourrissant sur des sapins baumiers (*Abies balsamea*), 43 parasitoïdes primaires et 21 entomopathogènes furent identifiés sur l'insecte (Eveleigh & al, 2007). La durée d'une épidémie non combattue est imprévisible puisque plusieurs facteurs entre en jeu, la température et la quantité de précipitations ont, par exemple, une multitude d'effets sur l'insecte (Gray, 2013). Il est d'ailleurs nécessaire, pour des raisons économiques et d'aménagement du territoire, que des mesures de contrôle des populations de TBE soient utilisées.

La principale méthode utilisée de nos jours, et la seule utilisée au Québec depuis 1987 (Ministère des ressources naturelles, 2012), est l'épandage d'insecticide biologique, plus précisément, de la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*B. t.*). Ce bacille produit une delta-endotoxine, une protéine toxique pour la tordeuse et quelques autres Lépidoptères (Bravo & al, 2007). Appliquée sur les, les aiguilles toxines sont ingérées par les chenilles et entraînent des dégâts au système digestif de celles-ci suivi d'une septicémie (Bravo & al, 2007). La pulvérisation vise non pas à éradiquer la tordeuse mais bien à éviter la mortalité et les pertes de croissance des arbres souffrant continuellement de défoliation.

C'est au printemps que l'épandage a lieu et seulement après avoir analysé chaque cas et déterminé le traitement à prescrire (Ministère des ressources naturelles, 2012).

Avant 1987, les principaux insecticides utilisés étaient le fénitrothion (O,O-Dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate) et le matacil (4-(diméthylamino)-3-méthylphényl méthylcarbamate). Le premier s'est avéré toxique pour certains pollinisateurs comme les abeilles (Okada & Hoshiba, 1970; Kevan, 1975) et le dernier pour plusieurs organismes comme les petits pollinisateurs, les mouches, les jeunes saumons de l'atlantique et certains invertébrés marins et d'eau douce (Thomson & al. 1985; McLeese & al, 1980). Au Québec, ces insecticides ne sont plus utilisés dû à leur toxicité. Il est cependant nécessaire de trouver de nouvelles méthodes pour limiter les dégâts causés par la tordeuse. L'utilisation de résistances déjà présentes dans la nature afin d'introduire des arbres résistant dans des plantations serait une option efficace, durable et peu coûteuse qui est en accord avec le principe de lutte intégrée (Alfaro & al, 1995).

Contrairement à ce qu'indique son nom, la tordeuse des bourgeons de l'épinette a une préférence pour le sapin baumier et c'est l'espèce qui est la plus sévèrement endommagée (Candau & Fleming, 2011; Kucera et Orr, 1980). Mis à part ce dernier, l'épinette blanche est la deuxième espèce la plus atteinte suivie par l'épinette rouge (*Picea rubens*) et la noire (*Picea mariana*) (Nealis and Régnière 2004). D'autres espèces de conifères comme l'épinette de Norvège (*Picea abies*), le mélèze laricin (*Larix laricina*), le pin gris (*Pinus banksiana*) et la pruche du Canada (*Tsuga canadensis*) peuvent être touchés mais représente une proportion négligeable des arbres attaqués par la TBE (Ressources Naturelles Canada, 2012; Candau & Fleming 2011). L'épinette noire est moins affectée que

d'autres membres du genre *Picea* principalement à cause des aiguilles des années précédentes qui ne représentent pas une source alimentaire adéquate pour les larves qui émergent de diapause (Blais 1957; Nealis and Régnière 2004).

L'épinette blanche

L'épinette blanche est un des arbres le plus répandus au Canada (figure 1.1 B). C'est une des principales espèces qui composent la forêt boréale mais on le retrouve aussi jusqu'au sud des grands lacs. Il est parmi les arbres d'Amérique du Nord ayant la répartition atteignant la plus haute latitude. On le retrouve souvent à la limite arctique des arbres jusqu'à 69° nord. Il peut être planté dans une multitude de sols et de conditions climatiques (Beaulieu, 1996).

L'épinette blanche détient un rôle économique très important au Canada et au Québec. Dans cette province uniquement, 25 millions de plants sont utilisés pour le reboisement à chaque année (Gosselin, 2013). Le bois est utilisé comme matériaux de construction divers, planches, contreplaqués, cadres, et autres. Il est aussi très utilisé pour la pâte à papier (Forestry innovation investment, 2012). Son rendement de 4,6m³/ha par année, en fait un candidat de choix pour son utilisation comme matériel de construction et explique que ce soit l'une des premières essences ayant été ciblée par un programme d'amélioration génétique qui fut mis en place dès la fin des années 50 (Beaulieu, 1996).

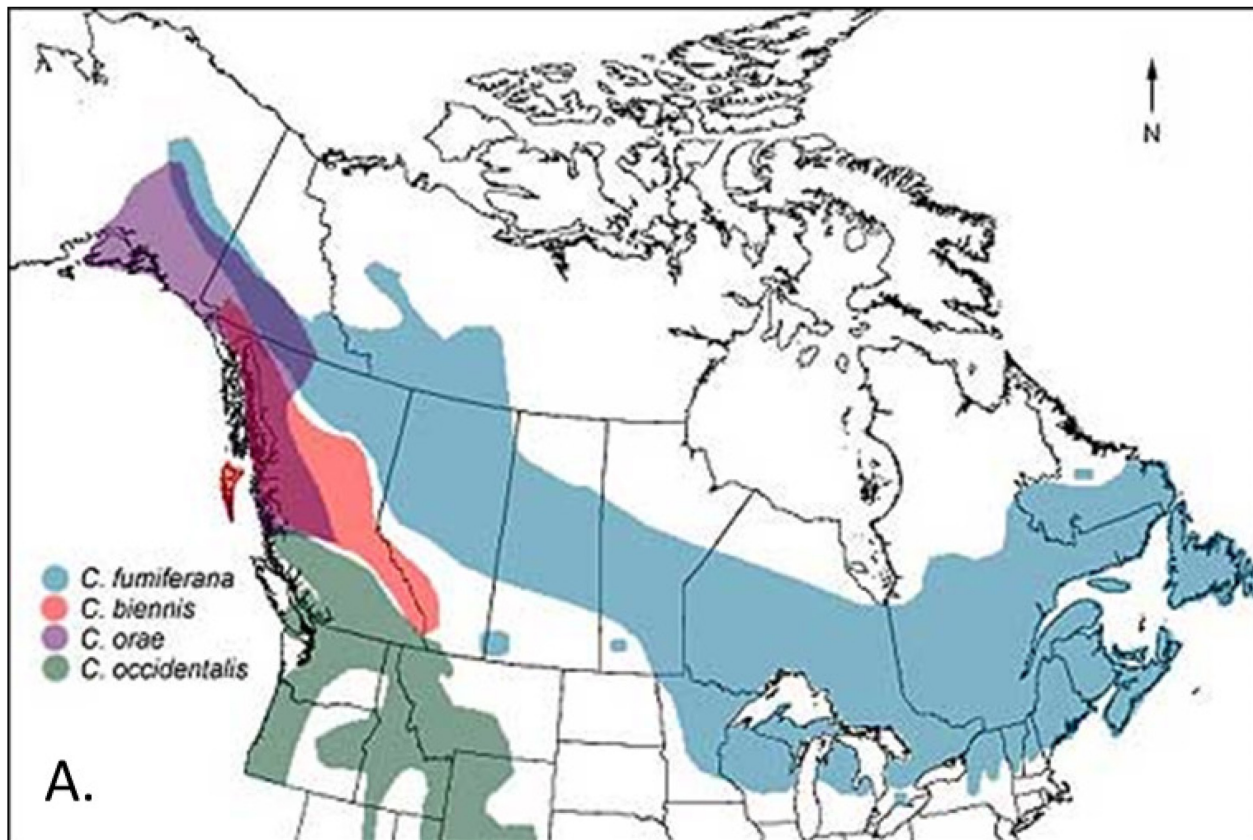


Figure 1.1 : Aires de répartition

A. Tordeuse des bourgeons de l'épinette. (<https://cfs.N-Rcan.gc.ca/projects/107>)

B. Épinette blanche (<http://tidcf.N-Rcan.gc.ca/trees/factsheet/38>)

Les interactions entre plantes et organismes nuisibles

Il est généralement accepté qu'une grande partie de la diversité qu'on observe dans le domaine du vivant, a été générée par la coévolution entre les espèces et leurs prédateurs, parasites et pathogènes (Thompson, 1994). La pression exercée par les organismes nuisibles pour les plantes ainsi que l'impossibilité de se mouvoir a généré un éventail impressionnant et diversifié de défenses chimiques et morphologiques (Morant & al, 2008; Rausher, 2001).

Plusieurs enzymes et composés chimiques impliqués dans les défenses végétales ont une multitude d'autres fonctions. Certaines études remettent en question la possibilité que les insectes et pathogènes s'attaquant aux plantes soient assez nombreux et sévères pour appliquer une pression évolutive résultant en des mécanismes de défense (Rausher, 2001). Par exemple, les flavonoïdes jouent un rôle dans la reproduction de certaines plantes et la protection contre les UV. Une forte corrélation entre les plantes résistantes et des niveaux élevés de flavonoïdes est remarquée chez plusieurs espèces (Koes et al, 1994). Les β -glucosidases constituent un autre exemple avec un grand nombre de rôles physiologiques dont tous les processus impliquant la transformation de cellulose en glucoses et leur action activatrice de certains composés liés à la défense (Morant, 2008; Hill & Reilly, 2008). Cependant, des études récentes ont obtenus des résultats montrant que les herbivores, insectes, bactéries, virus et champignons qui s'attaquent aux plantes génèrent bel et bien une pression suffisante à l'élaboration ou la modification de moyens de défenses (Rausher, 2001; Züst, 2012). Il y a donc une certaine incertitude en ce qui concerne les forces qui

dirige les interactions entre les organismes pathogènes ou les herbivores et leurs hôtes mais plusieurs cas sont étudiés de manière spécifique due à la valeur élevée des plantes touchées.

Les mécanismes de défenses naturels des plantes restent néanmoins souvent les méthodes les plus efficaces pour les protéger des herbivores et parasites indigènes avec qui ils partagent un historique de coévolution (Broekgaarden & al, 2011). C'est d'ailleurs pourquoi on cherche de plus en plus à remplacer les pesticides et que la recherche sur les résistances naturelles aux pathogènes et insectes ravageurs chez les plantes est un domaine de plus en plus documenté (Todesco & al, 2010; Alfaro et al, 2008; Yanchuk et al et al, 2008; Clancy et al 2002; Alfaro et al, 1996; Broekgaarden & al, 2011).

Survol des mécanismes de défense des plantes

Les végétaux ne possèdent pas de système immunitaire comme on le voit chez les animaux. Cependant, ils ne sont pas totalement impuissants face aux maladies et aux organismes nuisibles. Les arbres, ou de manière plus générale, les plantes, ont développé plusieurs mécanismes de défense contre les pathogènes et herbivores afin de limiter les dégâts, arrêter une infection ou tout simplement tuer ou affaiblir les organismes qui s'en nourrissent (Freeman & Beattie, 2008).

Les mécanismes de défenses des plantes peuvent être séparés en deux grandes catégories, les mécanismes constitutifs et les réponses induites. Les mécanismes constitutifs sont assez diversifiés. Les parois cellulaires, les cuticules cirées, l'écorce et les épines sont

des exemples de mécanismes constitutifs qui agissent d'une manière physique en offrant à la plante de la rigidité et de la protection. Ce type de défense est surtout utile contre les herbivores mais certains d'entre eux, lorsque intacts, peuvent aussi agir comme barrière empêchant l'intrusion de pathogène (Freeman & Beattie, 2008; Kessler & Baldwin, 2002). Les plantes peuvent aussi produire des métabolites secondaires, comme par exemple les composés phénoliques, toxiques qui affectent suffisamment les herbivores pour qu'ils arrêtent l'ingestion des tissus toxiques. Le désavantage des défenses constitutives est le coût nécessaire à la production et l'entretien de ces dernières, même en absence d'herbivores ou de pathogènes. Dans le cas de substances toxiques, elles ont parfois une certaine toxicité pour la plante aussi et un coût additionnel doit donc être investi pour le stockage des précurseurs (Kessler & Baldwin, 2002). Il est plus avantageux pour une plante qui subit des attaques répétées, d'investir dans des défenses constitutives, que pour une plante qui n'est qu'occasionnellement ciblée (Wittstock & Gershenzon, 2002).

Les réponses induites représentent un mécanisme de défense efficace du point de vue des coûts investis car les produits toxiques, par exemple, ne sont synthétisés que lors d'une attaque. Cependant, c'est une méthode qui peut s'avérer risquée lorsque l'infection ou la destruction des tissus est trop rapide ou cause trop de dommages pour que la plante puisse se défendre de manière efficace (Wittstock & Gershenzon, 2002). Certains mécanismes induits font intervenir l'action des β -glucosidases pour la libération de composés actifs.

Le rôle des β -glucosidase dans la défense

Les β -glucosidases, plus précisément celles appartenant à la famille 1 des glycosides hydrolases, sont des enzymes très répandues qui sont présentes dans plusieurs domaines du vivant. Elles catalysent l'hydrolyse des liens glycosidiques β entre un glucide et un substrat tel un phénol glycosylé (Morant & al, 2008; Hill and Reilly, 2008). L'enzyme ne fait pas preuve de haute spécificité par rapport au substrat glycosylé (Hill and Reilly 2008). Chez les plantes, elles jouent un rôle dans un grand nombre de processus physiologiques de base tel que la lignification et la dégradation des parois cellulaires ainsi que l'activation de phytohormones et de composés chimiques impliqués dans la défense de l'organisme. L'addition d'un ose à un aglycone a plusieurs effets, comme l'augmentation de sa solubilité dans l'eau et de sa stabilité chimique, une réduction de sa réactivité chimique et une modification de son activité biologique (Jones & Vogt, 2001). C'est d'ailleurs pourquoi certains métabolites secondaires sont présents sous une forme glycosylée dans la cellule. Un des rôles de la β -glucosidase dans les situations de défense est donc d'activer des composés biologiquement inertes présents dans la cellule pour les rendre actifs. Dans certains cas l'enzyme est déjà synthétisée et entreposée dans un organite séparé des glycosides. Lorsque la cellule est endommagée par une attaque, il survient un mélange du milieu cellulaire ce qui déclenche la réaction rendant les tissus touchés toxiques (Morant & al, 2008).

Les composés phénoliques

Les phénols, ou composés phénoliques, sont un type de composés organiques constitués d'un groupe hydroxyle lié à un groupement hydrocarbure aromatique. Ils sont produits par une multitude de végétaux et qui occupent une panoplie de fonctions comme antipathogènes, précurseurs de polymères structuraux et molécules signalétiques (Hammerschmidt, 2005). Ils font partie des métabolites secondaires les plus abondants dans les tissus végétaux. La concentration en composés phénoliques est très variable selon la saison, l'individu et le stade de développement (Boeckler & al, 2011). Les phénols sont surtout étudiés pour leur rôle dans les situations de stress (Kraus & Spiteller, 1996; Lokke, 1989) ainsi que pour leur association à la résistance contre les infections fongiques, bactériennes et virales chez plusieurs plantes incluant un grand nombre d'arbres de l'hémisphère nord (Harbrone, 1980; Witzell & Martin, 2008; Li, 2002; Maher, 1994). Chez les pins, la présence de phénols a été associée à la grande résistance aux champignons que possède le duramen. Certains flavonoïdes, stilbènes et acétophénones retrouvée dans le phloème de membres des genres *Pinus* et *Picea* ont été liés à la résistance contre des champignons associés à des coléoptères xylophages comme le dendroctone du pin (*Dendroctonus ponderosae*) (Witzell & Martin, 2008). Il existe un grand nombre de familles de phénols mais, ce sont des acétophénones (figure 1.2) qui ont été impliquées dans la résistance contre la TBE. Malgré la versatilité des composés phénoliques et leur rôle important dans la défense contre les insectes et pathogènes, très peu d'exemples de sélection pour des concentrations élevées de phénols existe dans les programmes d'amélioration d'arbres (Witzell & Martin, 2008).

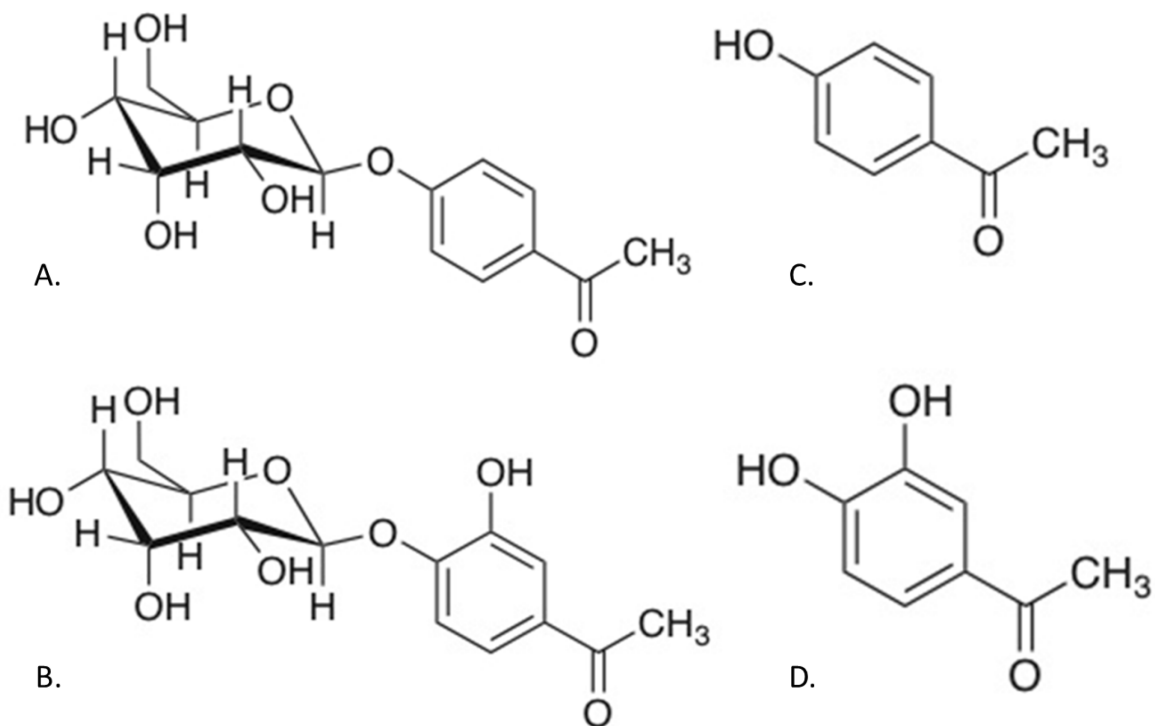


Figure 1.2 : Acétophénones impliqués dans la résistance à la TBE.

A. Picéine B. Pungénine C. Picéol D. Pungénol

Mise en contexte

Daoust & al (2010), ont découvert l'existence d'épinettes blanches ayant subi très peu de défoliation, en comparaison aux autres arbres de la même plantation, suite à une attaque sévère de la tordeuse entre 1998 et 2007. Ces auteurs ont montré une composition chimique des feuilles plus élevée en phénols, tannins et deux monoterpènes (myrcène et α -pinène) dans le feuillage des arbres dits « résistants ». Les monoterpènes auraient un rôle dissuasif sur la TBE et son action serait liée étroitement avec la cire épicuticulaire présente sur les aiguilles. Des expériences ultérieures, ont permis de mettre en évidence un autre

facteur majeur de cette résistance naturelle à la TBE (Delvas & al, 2011). La présence de deux phénols, toxiques pour la tordeuse, contribue à expliquer la faible défoliation des arbres identifiés comme résistants. À l'aide de chromatographie en phase liquide à haute performance, les composés qui différaient entre les deux classes phénotypiques ont été identifiés.

Dans le cas des arbres non-résistants, deux glucosides phénoliques, la picéine [3-(b-D-glucosyloxy)-hydroxy-acetophenone] et la pungénine [3-(b-D-glucosyloxy)-4-hydroxy-acetophenone] furent détectés. Chez les arbres résistants, en plus de la picéine et de la pungénine aussi présentes, la forme aglycone était retrouvée, soient, les acétophénones pungénol (3',4'-hydroxy-acetophenone) et picéol (4'-hydroxyacetophenone) (figure 1.2). Dans des analyses subséquentes il fut déterminé que les acétophénone actives présentes chez les arbres résistants réduisaient le taux de survie des larves, retardaient leur développement et réduisait la masse de la puppe (Delvas & al, 2011).

Le gène candidat

Le gène qui produit la protéine qui catalyserait la transition des acétophénones glycosylés en leur forme biologiquement active est identifié *Pgβglu-1*. Ce dernier fait partie du groupe des glycosides hydrolases de famille 1 qui renferme une multitude de gènes mais celui ciblé par notre étude c'est avéré être exprimé de façon différente entre les deux classes phénotypiques observées et ce, sans ambiguïté. À l'aide d'une biopuce regroupant des sondes représentant près de 24 000 gènes de l'épinette blanche (Raheison & al 2012), les niveaux d'expression entre les arbres résistants et non-résistants furent comparés. Le

gène de la β glu-1 est celui pour lequel la plus grande différence d'expression fut observée. Ce dernier, avait une expression 773 fois plus élevée chez les arbres résistants. À titre de comparaison, les deuxièmes et troisièmes gènes dans la liste étaient exprimés 92 fois et 15 fois plus. Le deuxième gène ayant la plus grande différence d'expression entre les deux classes d'arbres faisait aussi partie de la famille des glycosides hydrolases. L'activité de la protéine a, par la suite, été confirmée par des expériences encore non-publiées (Mageroy et al, en préparation).

Hypothèses et objectifs

Le principal objectif de ce projet est de caractériser le gène *Pg β glu-1* et d'étudier son rôle ainsi les mécanismes impliqués dans le phénomène de résistance contre la TBE chez l'épinette blanche.

La première hypothèse veut qu'il existe une ou plusieurs différences dans la séquence du gène *Pg β glu-1* qui pourraient expliquer les différents phénotypes observés chez les arbres matures.

La deuxième hypothèse est qu'il existe une corrélation temporelle du niveau d'accumulation des transcrits du gène *Pg β glu-1*, de l'accumulation des acétophénones dans les aiguilles et des stades larvaires de la TBE responsables de la défoliation.

Enfin, la troisième hypothèse est que l'expression différentielle du gène *Pgβglu-1* qu'on observe chez les arbres mature est un trait transmissible à la progéniture et non due uniquement à des facteurs de l'environnement.

**Chapitre 2 – Molecular characterization and expression
of a novel resistance gene against spruce budworm
(*Choristoneura fumiferana*) in white spruce (*Picea glauca*
(*Voss.*) *Moench*)**

Gaby Germanos^{1,2}, Geneviève Parent^{1,2}, Isabelle Giguère^{1,2}, Martin Charest¹, Éric Bauge et John Mackay^{1,2}

¹Centre d'étude de la forêt, Département des sciences du bois et de la forêt, Université Laval, Québec, Qc, Canada G1V 0A6

²Institut de biologie intégrative et des systèmes, Université Laval, Québec, Qc, Canada G1V 0A

Résumé

Lors d'une épidémie localisée de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) dans le sud du Québec au début des années 2000, certains arbres d'une plantation d'épinette blanche affectée furent largement épargnés. Le faible taux de défoliation observé chez ces arbres a été associé à différents facteurs, notamment, l'accumulation dans les aiguilles de composés chimiques toxiques pour la tordeuse. Un gène (*Pgβglu-1*) codant pour une bêta-glucosidase a été identifié comme étant lié à la production de certains de ces composés chimiques, les acétophénones. Notre hypothèse est que la variation de l'expression du gène relève d'une régulation inhérente et unique aux arbres résistants. Des analyses comparatives ont été menées et trois volets principaux seront présentés en lien avec l'hypothèse de base. Nos résultats permettent d'établir une corrélation entre l'expression du gène, l'accumulation des acétophénones actives et le stade le plus destructif de l'insecte. Les expériences d'héritabilité sur des semis montrent que l'expression de la progéniture est transmise par la mère. Des tests d'inductions menés en conditions contrôlées sur ces mêmes semis ont révélés une réponse variable entre les familles atteignant jusqu'à une augmentation de 200% de l'expression. Les séquences d'ADN codant du gène ont été obtenues pour 14 arbres matures ayant subi l'épidémie de 1998 à 2007 et aucune différence n'a été observée permettant de différencier les arbres résistants des non-résistants. Une connaissance plus approfondie du phénomène pourrait aider au développement d'une lutte intégrée visant à mitiger les dégâts causés par la tordeuse en période d'épidémie, notamment par l'utilisation d'arbres résistants.

Abstract

During a localized spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) outbreak in the south of Quebec some trees of a white spruce plantation (*Picea glauca* (Voss.) Moench) were left almost untouched while many others had severe defoliation. The low levels of defoliation observed in those trees were attributed to many factors, one of them being the accumulation in the needles of chemical compounds, toxic for the budworm. A gene (*Pgβglu-1*) coding for a beta-glucosidase enzyme was identified and was linked to the accumulation of acetophenones. We propose that the expression variation of *Pgβglu-1* involves a regulation that is unique to resistant trees. Comparative analyses were conducted to test this hypothesis. Our results showed a correlation between gene expression, the accumulation of biologically active acetophenones and the most destructive larval instar of the insect. Heritability experiments on seedlings also show that *Pgβglu-1* expression in the progeny is influenced by the mother. Induction tests conducted in controlled conditions on the same seedlings revealed a varying response between families reaching a maximum increase of 200% in expression. Coding DNA sequences of the gene were obtained for 14 mature trees that suffered the 1998-2007 outbreak but no differences were observed that could differentiate the resistant from the non-resistant. Our results indicate that understanding the underlying cause of *Pgβglu-1* gene expression variation could help in the development of an integrated management aiming to mitigate damage caused during outbreaks, notably by using resistant trees.

Introduction

The spruce budworm (SBW) is one of the most destructive defoliating insect in North-America (Fleming, 2000). The severity of outbreaks and the magnitude of areas afflicted have been on the rise during the 20th century (Blais, 1983). The most recent outbreak, which lasted from 1973 to 1987, reached a peak in 1975 when over 35 million hectares of forest were estimated to have severe SBW damage in the province of Quebec (Ministère des ressources naturelles, 2013). The same outbreak caused the loss of approximately half a billion of cubic meter of wood from mortality and reduced growth, again in Quebec alone (Coulombe *et al.*, 2004). In 2013, the surface under SBW defoliation was estimated to 3 206 024 hectares representing a 44% increase from 2012 (Ministère des ressources naturelles, 2013).

From 1998 to 2007 (Bauce, unpublished) a localized SBW outbreak that took place in a white spruce plantation (*Picea glauca* (Voss.) Moench) located in the south of Quebec left some trees almost untouched while many others had severe defoliation (Daoust *et al.* 2010). The spruces from the plantation were separated in two phenotypic classes, the undamaged trees, with less than 30% of needle loss, were considered resistant (R) and the more heavily defoliated trees as non-resistant (N-R). Subsequent experiments revealed the accumulation of two acetophenones, piceol and pungenol in the foliage of R trees; the compounds were not detected in N-R trees. In contrast, their precursors, picein and pungenin, were found in the foliage of both R and N-R trees. Feeding tests with the insect confirmed that the two compounds found exclusively in R needles were toxic for the SBW, causing growth loss and death 49 % of the larvae (Delvas *et al.* 2011).

The *Pgβglu-1* was shown to accumulate transcripts in R trees at levels almost 773 times those observed in N-R trees (Mageroy et al., in preparation). *Pgβglu-1* is a member of the glycosyl hydrolase family 1, a family of enzymes known to catalyze the hydrolysis of the glycosidic bonds between a glycosyl residue and a molecule to which it is bound (Hill and Reilly, 2008). The differential expression (DE) of *Pgβglu-1* is proposed to be linked to the difference in acetophenones levels described in R and N-R trees. The discovery of this gene is believed to play an important role in the resistance and is a major step forward in understanding host-parasite interactions related to the SBW.

Naturally occurring resistance to insects in trees is a widely researched topic, especially for species that yield an economical value (Alfaro, 2008; Yanchuk et al et al, 2008; Clancy et al 2002; Alfaro et al, 1996). However, resistance against the SBW is not well understood and the underlying genetic or molecular mechanisms remain unknown. In order to establish the potential for using natural resistance traits for the benefit of forest health, several research questions must be addressed, including gene sequences and regulation, heritability and population diversity in host species including white and other spruces, as well as firs. This paper addresses several of these issues. We aimed to determine the structure and the complete sequence of the *Pgβglu-1* gene, evaluate the genetic heritability of the DE and finally study the fluctuation in *Pgβglu-1* gene expression and acetophenone accumulation during the growth season in relation to the SBW life cycle and to tree phenology. Our findings reinforce the hypothesis that the *Pgβglu-1* has a major role to play in SBW resistance.

Materials and methods

Plant material sampling and preparation

Progeny of seven resistant (R) and six non-resistant trees (N-R) were obtained by growing plants from open-pollinated seeds that were collected in September 2011 (120 to 200 seeds per tree), cleaned and stored at -20° C. Seeds were germinated and plants (seedlings) grown in standard conditions for *P. glauca*: high density polyethylene 110 ml pots, a standard potting mix of peat, perlite and vermiculite (60%, 20%, 20%, respectively) and fertilized weekly with 20/20/20. The plants were grown in a plastic greenhouse from June 2012 to April 2013, which represents an extended growth period. Half of them were then placed in cooled growth rooms for hardening off and put through a rest period of 13 weeks while the others were kept in growing condition in 1,7L pots. The seedlings were taken out of the growth rooms then transferred to 1.7 L pots in July 2013 and placed in an open end plastic house for growth.

The 4th of september, 20 trees from 8 families were sampled for the heritability experiment. After sampling, four families were selected and 20 trees of each were moved to a different greenhouse where they were sprayed with a jasmonic acid solution, a stress response regulator in plants (McConn & al, 1997; Germain & al, 2012), in attempt to induce expression of the *Pgβglu-1* gene. The solution was 500 μM of jasmonic acid stock solution in water. The stock solution was 500mM of acid jasmonic in ethanol. Two and a half hours separated the inductions and the saplings were sampled 5 hours after the first, flash frozen in liquid nitrogen and kept frozen until further manipulations.

Plant material for the experiment on mature trees was obtained from 48 years old white spruces (*Picea glauca* (Moench) Voss) in a plantation near Drumondville in Saint-Cyrille-de-Wendover (QC, Canada) during the summer of 2013. Tissue samples were collected from 10 randomly selected trees and consisted of current year needles from the median part of the foliage. Sampling was conducted 7 times during summer at the following dates: May 28, June 6, 18 and 27, July 24, August 13 and September 16. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen after collection and kept at -80°C until further use.

Frozen needles were ground using a MixerMill 300 (Retsch, Haan, Germany) and steel grinding balls cooled in nitrogen. The fine powder obtained was then kept at -80°C until RNA and phenolic compounds extractions.

RNA and DNA extraction and quality control

Total RNA was extracted following the method of Chang and al.(1993) with minor modifications described in (Pavy et al. 2008). Total RNA concentrations were determined spectrophotometrically using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and their quality were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano LabChips (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA).

Genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) following the instruction of the manufacturer. Total DNA concentrations were determined spectrophotometrically using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) and DNA integrity was assessed with agarose gel electrophoresis.

cDNA preparation and RT quantitative PCR

Complementary DNAs (cDNA) were prepared from 500 ng of total RNA using the first strand cDNA synthesis system (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions. RT qPCR mixtures contained QuantiFast SYBR Green PCR kit (QIAGEN) and were as follow: 1× master mix, 300 nM of 5' and 3' primers, and target cDNA (5 ng) in a final volume of 15µl. Reactions were setup using an epMotion 5075 pipetting robot (Eppendorf, Hamburg, Germany) and amplifications were carried out in a LightCycler 480 (Roche, Penzberg, Germany). Cycling was performed as follows: an initial 15-min activation step at 95°C, followed by 50 cycles of 94°C for 10 s and 62°C for 1 min; a single fluorescent read was taken after each cycle immediately following the annealing and elongation step at 62°C. Melting curve analysis was performed at the end of cycling to ensure single product amplification of the appropriate melting temperature (method from Boyle *et al.* 2009).

The elongation factor alpha (ef1a– BT102965), the cell division cycle cdc2 gene (BT106071), and a gene encoding a cytoplasmic ribosomal protein PgRPL3A-1 (BT115036) were used as endogenous control sequences to normalize the RNA abundance of candidate genes. The selection method for the reference genes is described in Beaulieu *et*

al. (2013). The numbers of molecules (transcripts) were calculated using the LRE methodology (Rutledge and Stewart 2008) adapted for Excel (Boyle et al. 2009).

Comparative sequencing and PCR

Primers for the *Pgβglu-1* gene (BT114253) were designed based on the white spruce gene sequence catalogue reported by Rigault et al. (2011), using the Primer3Plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) and Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) to verify the complementarity of the primers. The primers were also blasted against the catalogue to verify their specificity and were then used for PCR on genomic DNA sampled in 2010 from 7 resistant and 7 non-resistant adult trees from the Drummondville plantation. The amplification was conducted with the Platinum taq DNA polymerase High Fidelity (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the instructions provided by the manufacturer for the mixture preparation. The PCR program consisted of: 5 minutes at 94 °C followed by 35 cycles of 15 seconds at 94 °C and 1 minute at 62 °C and a final elongation step of one minutes at 68° C. Amplicons were sent the IBIS' sequencing platform (Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Université Laval, Québec) where they were purified with ExoSAP-IT® For PCR Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and sequenced with the Sanger method. The results were aligned and analyzed with BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Acetophenone extraction and high performance liquid chromatography analysis

Phenolic compounds were extracted from 50-100 mg of fine needle powder which had been kept at -80° C. Each sample was mixed with 600 µl of 70% MeOH containing 1 mg/ml of benzoic acid (internal standard) and incubated at 4°C on an agitation plate for 6 hours. The samples were then centrifuged at 13 000 rpm for 10 minutes. Afterward, the supernatant was removed and kept at -80° C while 600 µl of MeOH with benzoic acid was added again. The mix was then stored at 4°C on the agitation plate. The same steps were repeated 24 hours after the initial storage. The reaction was stopped for the last time at 48 hours and the supernatant was retrieved.

The Variant Prostar HPLC used for quantification was equipped with a UV detector 325, an autosampler 420 and a solvent delivery module 240. The acetophenones were separated through a Polaris MetaGuard 4.6mm precolumn and a Polaris 250 x 4.6 mm C18-A (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) column both heated at 62°C. The liquid phase consisted of solvent A: distilled H₂O with 0.2% of formic acid (HCO₂H) and solvent B: acetonitrile (CH₃CN) and 0.2% of formic acid. The following gradient was used: 0.0-0.5 minutes, 100-95% A, 5.0-10.0 minutes, 78-65% A, 13.0-16.0 minutes, 50-5% A, 17.0-17.1 minutes, 5-95% A and finally 18.0-20.0 minutes, 100% A. The flow rate was 1.5 ml per minute.

Statistical analyses

Analyses were performed with the R 3.0.1 software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) for the section on heritability and induction data and SAS 9.3 software (SAS institute, Cary, NC, USA) was used for the analysis of the seasonal fluctuation. The level of significance for every statistical tests was $\alpha = 0.05$.

An analysis of variance (ANOVA) was performed on the expression data from the seedlings from eight families and on the fold change between pre and post induction time. A logarithmic transformation was applied on gene expression data used, except fold change, to meet the assumption of normality and homogeneity of variance. Duncan's new multiple range test was used to establish differences between each of the eight families used in the heritability experiment and to compare the fold change between the four families used in the induction experiment.

A student t-test was used to compare overall expression of R and NR progeny. Paired student t-tests were used for each of the four families of the induction experiment to evaluate the expression contrast between pre and post induction time.

Effect of the date on expression levels and acetophenone accumulation was analyzed with a mixed procedure ANOVA. An autoregressive correlation term of order 1

was included to correct for serial correlation of the data. Differences between least squares means was then assessed with a Tukey-Kramer test.

Assays	Primer ID	Sequences (5' -->3')	Tm	Position ³ in cDNA	Position ³ in gDNA	Primer Pair
cDNA cloning and analysis						
RT-qPCR ¹	βglu-E1-F	GCCCAGGCTAATATATCACAGCAAG	64,1	1091	-----	βglu-E1
	βglu-E1-R	GTTGTCGAAATCACCATACCCTGTC	64,9	1264	-----	βglu-E1
Comparative sequencing ²	βglu-P1-F	GCGATGAGATTTGGTTCCACTGTAG	65,1	-----	8	βglu-P1
	βglu-P1-R	GAAGCTGGAACCTGATAAGCAGATG	64,5	-----	700	βglu-P1
	βglu-S1-F	CGCCTTCAACTACGCTATAAAATTCTG	63,3	-57	486	βglu-S1
	βglu-S1-R	GACCAGGAAATAGAAAAACGATAGAGG	62,6	335	1256	βglu-S1
	βglu-S2-F	GGATGTTGCGGTAGATCAATACCAC	64,7	240	1007	βglu-S2
	βglu-S2-R	CGTAGCCATATAATGTAAAGGTCAGCG	64,7	709	1932	βglu-S2
	βglu-S3-F	CTTTCGGAGACCGTGTGAAGTATTG	65,1	557	1780	βglu-S3
	βglu-S3-R	GTTTGAGTATGGCACCATCCAGTTC	65,0	834	2155	βglu-S3
	βglu-S4-F	CACATAGCGCCGCTGTCAAAAC	67,0	731	1954	βglu-S4
	βglu-S4-R	GTGGGATTGTTGACCGTAAAGTATG	62,7	1053	2530	βglu-S4
	βglu-S5-F	GTCGGGGAAGTACCCTGATTCTATG	65,0	907	2384	βglu-S5
	βglu-S5-R	TTTATCACTTCCCTCAATCCAGCAG	64,7	1194	2925	βglu-S5
	βglu-S6-F	AACGGAGTTTACGTTGGATCCTCTG	65,6	1118	2731	βglu-S6
	βglu-S6-R	CCTTATGGCTTCAAGTAGGGATGATAG	63,4	1354	3204	βglu-S6
	βglu-S7-F	ACTGAGACAGGGTATGGTGAATTCG	64,6	1235	2966	βglu-S7
	βglu-S7-R	CCAAGTGCAGTTGCAGGAATAAATG	65,8	1549	3488	βglu-S7
βglu-S8-F	CGAGTGGATATGACTATCGCTTTGG	65,0	1413	3352	βglu-S8	
βglu-S8-R	CATGGACCTCAACAACAATCTGAG	63,0	1705	3644	βglu-S8	

Table 2.1:Primer sequences used for quantitative PCR analysis and sequencing assays.

¹ Primers used in RT-qPCR assays for cDNA amplifications of R and N-R trees to determine the RNA transcript levels of the Pgβglu-1 gene.

² Primers used for PCR amplification and sequencing of the Pgβglu-1 cDNA and genomic sequences.

³ Position was determined relative to the first coding ATG in the cDNA (negative values are in the 5'-UTR), and relative to the first nucleotide of the available genomic sequence.

Results

Gene sequencing and structure analyses

The *P. glauca* *Pgβglu-1* cDNA sequence has been reported (MacKay, unpublished: Genbank) and a partial mRNA sequence was previously released (Rigault et al. 2013). In the present study, genomic DNA sequences representing the transcription unit (complete CDS, 3' and 5' UTRs) and a short stretch of upstream flanking 5' DNA were isolated to enable comparative analyses. The sequences were obtained for 14 trees (7 R and 7 N-R) by PCR amplification followed by amplicon sequencing (see methods for details). The 5' flanking sequence was obtained from a scaffold of the *P. glauca* genome assembly (Birol et al., 2013). Exons and introns were identified and positioned by alignment of the amplified genomic fragments against the cDNA (Figure 2.1). The resulting genomic sequence was 3514 bp in length; it contained 13 exons (total of 2121 bp) and 12 introns (1393 bp).

The *P. glauca* β glu-1 gene was most similar to *A. thaliana* beta-glucosidase 40 (BGLU40) and a close homolog was also identified in *Oryza sativa* (Os04g0474900). The amino acid sequences were conserved at 49% and 53% of the sites with *A. thaliana* and *O. sativa*, respectively. Gene structures were very similar between the three species, except that *A. thaliana* had 11 exons instead of 13 as found in *P. glauca* and *O. sativa* (Figure 2.1). As might be expected, coding sequences similarity was much higher when compared with homologs identified in other conifers, including loblolly pine (*Pinus taeda*: 86%) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*: 76%). Several other similar sequences belonging to glycosyl hydrolase family 1 were found in the *P. glauca* (Rigault et al., 2011) and *A. thaliana* and *O.*

sativa, representing 26, 14 and 7 closely resembling genes, respectively.

Comparative sequence analyses aimed to search for genetic differences between R and N-R trees that could be related with the DE and to insect resistance. Our hypothesis was that the DE of *Pgβglu-1* that was described (Mageroy, in preparation) was caused at least in part by genetic variations between the trees with R and N-R phenotypes. The data did not reveal any polymorphisms within the *Pgβglu-1* gene that could discriminate between R and N-R trees or shed light on the mechanisms involved in the DE. While a number of SNPs were found, they represented variations in individuals within each group and did not follow the pattern that we had predicted based on the phenotypes of the trees. An AMOVA (**A**nalysis of **M**olecular **V**ariance) showed that the large majority of the variance (96%) was within each of the phenotypic classes and not between them. This observation indicates that the cause of the DE is not related to variations within the DNA sequences that were analyzed but may be located elsewhere in the genome.

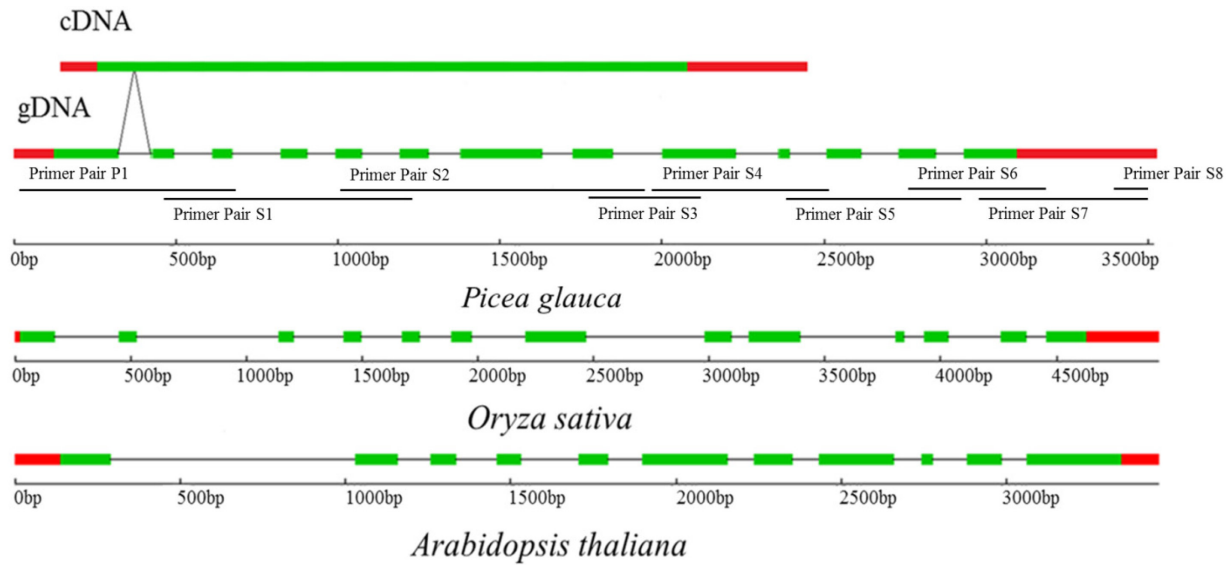


Figure 2.1: Comparison of gene structure between *Picea glauca*'s *Pgβglu-1* and most similar homologs in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*.

Position of primers that were used for amplification and comparative sequencing of *Pgβglu-1*. The gene from *A. thaliana* represented is BGLU40 and the gene from *O. sativa* is Os04g0474900. Green boxes represent exons, lines represent introns and the red boxes represent the TUR. For primer names, position and sequence, see Table 1.1.

Heritability and inducibility

Transcript accumulation was determined by RT-qPCR with gene specific probes as an indicator of the *Pgβglu-1* gene expression. Six-month old open-pollinated offspring of from both the R and N-R trees were tested and none of them expressed the gene. We hypothesized that expression may be age or size dependent, or alternatively require induction. Further testing was carried out on one year old plants, part of which were allowed to continue growing freely in the greenhouse and part of which were put through a dormancy cycle before continuing their growth. Results obtained from plants that were larger in size or that had begun a second growth season showed that some of the trees in each of the groups had a significant level of expression of the *Pgβglu-1* gene. These results

indicated that emergence from a rest period or reaching a superior size is not necessary for expression but might be sufficient and that trees as young as one year old can accumulate *Pgβglu-1* transcripts. Only the one year old spruces that were in growth conditions during the winter were used for the following experiments for uniformity purpose.

The expression level of the *Pgβglu-1* gene in o-p progeny (n=75), of four R and four N-R mother-trees, was determined and compared. The objective was to establish if the DE observed in the parents was passed down to the next generation. The average transcript accumulation level in trees from R mother-trees was 18 times more than those from N-R mother-trees (T-test, p value < 0.001; figure 2.2). Individual o-p families were then compared to evaluate the pattern of inheritance in more detail (fig 2.3). The means of three of the four R families were significantly higher than their N-R families (ANOVA, F-value = 13.12, p-value <0.001). Considering that only the phenotype of the mother-tree was known, i.e. R or N-R and that we observed a significant difference in transcript accumulation between their offspring, the data strongly indicate that the DE is heritable. The data also indicated that expression among the progeny of R trees is highly variable and some of the progeny have very low expression, which is easily explained by the fact that they resulted from wind pollination likely involving several male parents.

We also observed that even among the seedlings from R mothers, transcript levels were 5 to 10 times inferior to the levels detected in mature test trees. We hypothesized that the higher expression in the parents could result from after effects or induction of gene expression following the recent outbreak of SBW in the plantation. Alternatively, the offspring may have been simply too young to have high *Pgβglu-1* expression. We tested

whether *Pgβglu-1* expression was inducible in young trees by using two families from R mothers and two from N-R mothers among those analyzed in the heritability experiment were used. Transcripts accumulation was measured before and after induction with jasmonic acid, a stress response regulator in plants (McConn & al, 1997; Germain & al, 2012). The induction aimed to test the hypotheses that gene expression was inducible. Three of the families showed a significant increase in expression after induction, and the progeny of one N-R mother (8N-R) did not respond to the treatment. While statistically significant (p-value < 0.05), the increased gene expression in the progeny of 5N-R was much lower than in the two R families (table 2.2). Average variation in expression was also significantly different between the 1R family and the two N-R families. Following induction, transcript accumulation in some seedlings reached similar levels as observed in mature R trees.

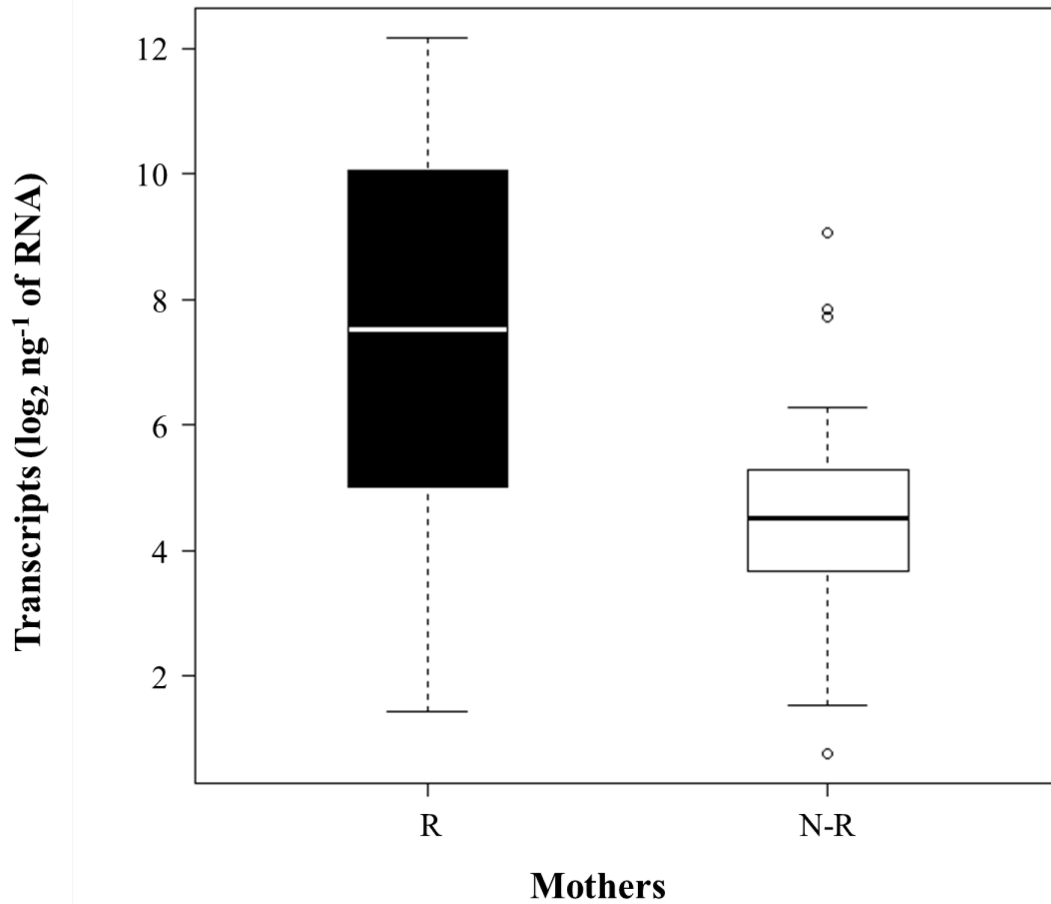


Figure 2.2: Expression level of the *Pgβglu-1* gene in trees from R and N-R mothers. (n = 75, 8 families, 4 R and 4 N-R with approximately 20 individuals per family) Student t-test p value < 0.0001. Expression levels were quantified by qPCR.

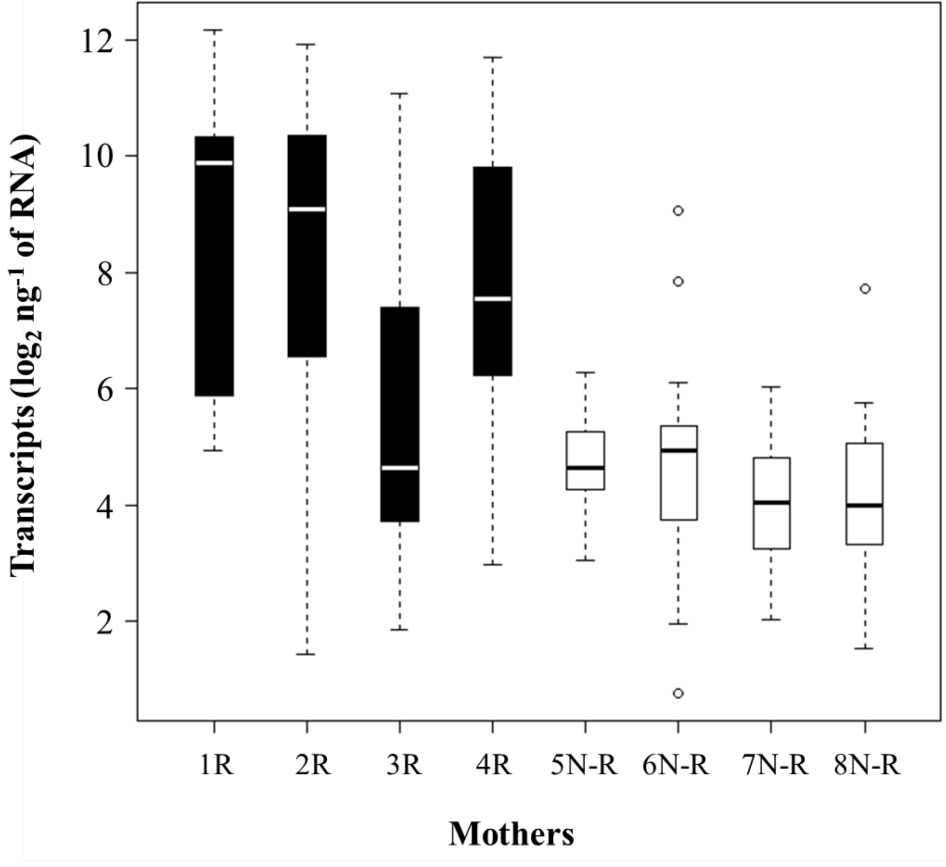


Figure 2.3: Expression level of the *Pgβglu-1* gene in trees from eight different mothers. (n = 75, 8 families, 4 R and 4 N-R with approximately 20 individuals per family) ANOVA F value = 13.12, p value < 0.0001. Expression levels were quantified by qPCR.

Trees	Average fold change	Group
1R***	3.27	a
3R**	2.05	ab
5NR*	0.94	b
8NR	0.30	b

Table 2.2: Average fold change of the expression of *Pgβglu-1* gene for each family pre and post induction time.

Families with the same letter are not significantly different after induction. Asterisk by the name of the trees represent whether or not this family saw a significant increase in expression after induction.

“***” significant at 0.001, “**” significant at 0.01, “*” significant at 0.05

Seasonal fluctuation

Mature R (n=5) and N-R (n=5) trees as described here were sampled throughout the growing season to assess if the level of expression of the *Pgβglu-1* gene varied along with phenology. We hypothesized that expression should be timed to allow accumulation of acetophenones during larval stages associated with the heaviest level of feeding. The five N-R trees did not accumulate transcripts of the gene in considerable amounts and the number of transcripts did not fluctuate during the sampled period. The R trees, however, accumulated high levels of transcripts early in the beginning of the season. The expression dramatically increased between the 6th and 18th of June (figure 2.4). From June 18th until the end of the season, expression levels of the *Pgβglu-1* gene were significantly higher in R tree than in N-R.

Determinations of acetophenone concentrations in the needles revealed that piceol and pungenol begin to accumulate at approximately the same time in R trees and vary somewhat through the summer. Piceol was not present in significant amount in N-R trees while pungenol accumulated slightly but at levels much lower than in R trees. The concentrations of piceol and pungenol in R needles at the third point (June 18) seen on figure 2.4 were not statistically different from those measured in N-R trees. Picein levels also varied considerably during the season, starting at very low levels and accumulating to high levels by the end of June, but were not different between R and N-R trees.

The aglycon concentrations in R trees were over two times the concentrations that were previously shown to reduce larval survival and pupal mass (Delvas, 2011). The peak of expression and acetophenone accumulation were closely timed with the sixth larval stage

of the SBW as was observed on the field site from 1999 to 2007. It is at the sixth instar that the SBW eats 90% of the food it ingests during the entirety of its larval phase (Carisey & Bauce, 1997). These results show that the differences observed between the R and N-R trees during the outbreak are associated with expression levels of the *Pgβglu-1* gene and that expression was highly variable during the studied time span. The correlation between the highest level of transcript accumulation, the presence of the biologically active acetophenones and the most destructive larval instar of the SBW are indicative of a synchronism between the biological life cycle of the pest and the expression of the resistance phenotype.

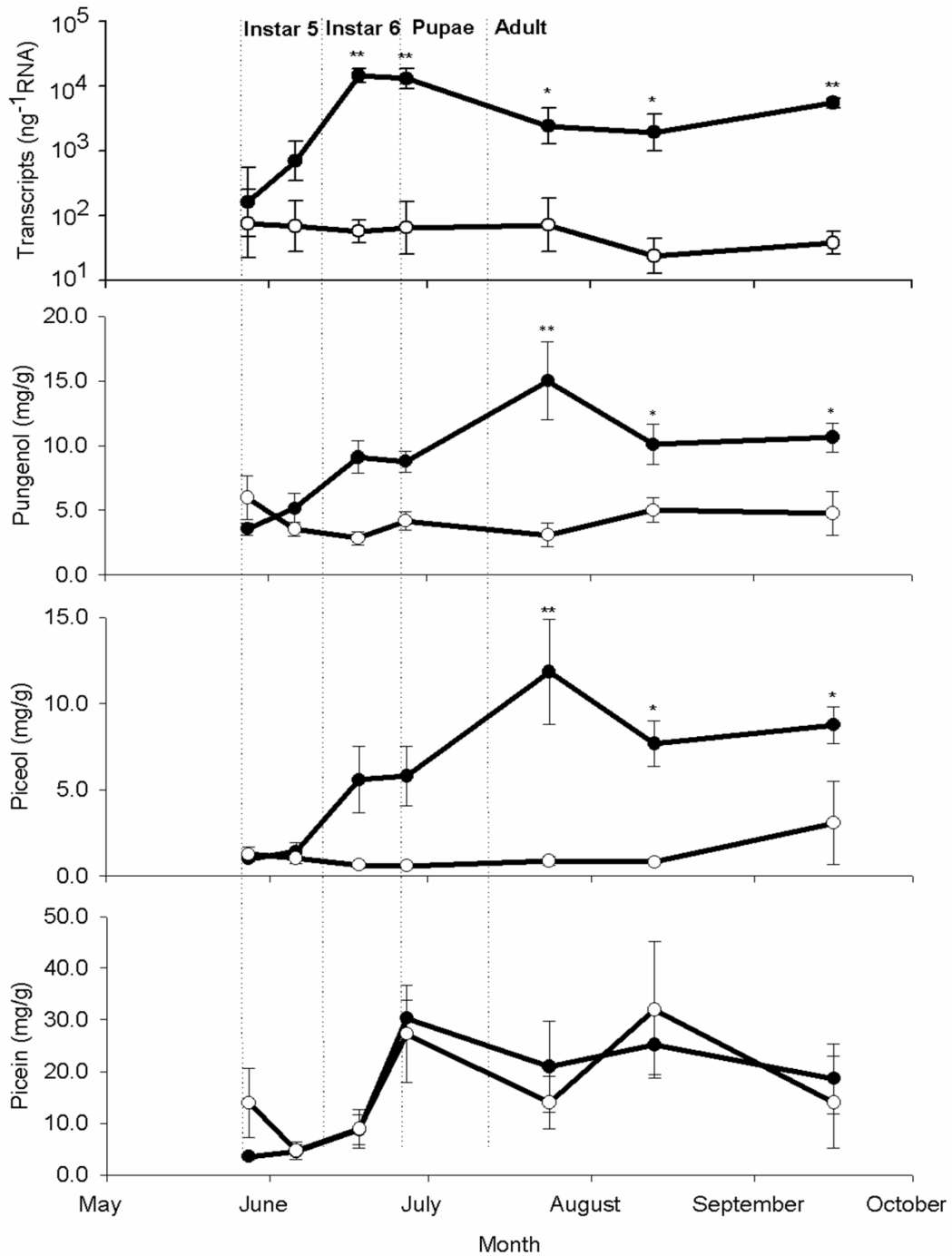


Figure 2.4: Temporal variation of *Pgβglu-1* expression and acetophenones concentration.

2013 growing season (n=10, 5 R and 5 N-R), Fifth and sixth larval instar, pupae and adult are also represented at the time points during which they occur. “***” R is significantly higher than all N-R determinations, “*” R is significantly higher than N-R points at same date. Black circles represent resistant trees and white circles represent non-resistant trees.

Discussion and conclusion

The SBW is indigenous to eastern North America and is natural pest of spruce and fir forests. The present study showed that the DE *Pgβglu-1* between R and N-R trees could be passed down to progeny and increased via induction with jasmonic acid. The role and genetic control of *Pgβglu-1* expression and accumulation of biologically active acetophenones in SBW resistance was supported by their profiles in R trees during the growing season as it matched with critical phases during the SBW life cycle monitored on the same site over 10 years. The complete sequences of the transcription unit of the *Pgβglu-1* gene was obtained for both R and N-R trees but were insufficient to discriminate between them, suggesting that the underlying molecular mechanisms may be located in flanking DNA sequences or at independent loci. Our findings are discussed in regard to their evolutionary implications and the ecophysiological factors influencing the SBW-spruce interactions.

Genetics and evolutionary implications

The genetic mechanisms underlying the differences between R and N-R trees described in the present study remain unexplained. While polymorphisms within the gene have been ruled out as having a causal role in expression, our analyses only represent a first step in the identification of responsible factors. There are many ways by which expression can be regulated and we only explored variation within the gene itself, as it could result in premature termination of transcription (e.g. through non-sense mediated mechanisms) or decreased RNA stability. The promoter and cis regulatory sequences such as enhancers found in 5' flanking regions, for instance, play a central role in regulation of expression

(Juven-Gershon & Kadonaga, 2010) and polymorphisms in this region have been shown to alter expression of the neighboring gene in many organisms (Yu & al, 2001; Bélanger & al, 2005; Zhang & al, 2008). It would be reasonable to direct efforts toward finding a genetic difference between the R and N-R trees in the promoter region of the *Pgβglu-1* gene. The accumulation of multiple copies of the gene – i.e. copy number variation (CNV) - could also explain the high levels of expression we observed in some trees. However, the DE was extremely contrasted and it seems unlikely that a dosage effect as is usually expected when CNV is the principal cause of DE would be sufficient to result in such differences unless a separate mechanism such as the suppression of expression is involved (Woodwark & Bateman, 2011; Perry & al, 2007).

The SBW resistant phenotype that we investigated would appear to confer a selective advantage considering that attack by the SBW during outbreaks is frequently lethal when sustained over several years. Therefore, one can wonder why the trait (i.e. accumulation of acetophenones) is not yet fixed in the white spruce population. Because of the small sample of trees studied it is not possible to infer how frequent or variable it is in the population. Our work provides an indication that it is likely to be heritable from indirect evidence based on inheritance of the *Pgβglu-1* gene expression. This is a prerequisite for the trait to be maintained in the population but is not sufficient as such. Other analyses suggest that high levels of variation in the trait is not unique to the trees studied here (Parent et al., unpublished) but the sampling of additional locations will be required to make inferences pertaining its abundance, maintenance and mode of transmission in population.

The synthesis and accumulation of picein, piceol and pungenin in other members of the *Picea* genus, such as Norway spruce (*Picea abies*) (Witzell & Martin, 2008; Münzenburger, 1990; Lokke, 1989), and the amino acid sequence similarity between *Pgβglu-1* and a closely related gene in loblolly pine suggest that it is unlikely that the resistance is a newly acquired trait. Another explanation of the lack of fixation would be trade-offs associated with the production and accumulation of biologically active acetophenones that would confer a superior fitness to N-R trees between outbreaks. An example of a known trade-off is the late budburst of some Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* [Beissn.] Franco) that confers protection against western spruce budworm (*Choristoneura occidentalis*) defoliation but results in a reduced competitive ability (Chen & al, 2003). In white spruce, the accumulation of phenolic aglycons could also have negative impacts on the tree fitness, associated with cellular toxicity (Wittstock & Gershenzon, 2002). The production of piceol and pungenol could also represent a high energy cost for individuals that produce them and have an impact on their growth or biomass production.

Ecological and physiological implications of acetophenone-based SBW resistance

Accumulation of secondary metabolites after wounding by an insect or a pathogen is quite common in many plants and is a well-studied topic (Reymond and Farmer, 1998). An extensive review of the phenolic metabolites and their role in northern tree defenses against insects, fungi, virus and bacteria showed just how widespread these compounds are and the vast array of pathogens that trigger their accumulation (Witzell & Martin, 2008). In the present study, the trees did not have significant levels of SBW feeding during the year

of sampling nor for the five previous years as no larvae or damage to the trees was observed. This indicates that the resistance mechanism is likely to be constitutive, at least in part. R trees do not rely on insect feeding as a short term trigger for the production of piceol and pungenol but our results also indicate that they can respond with enhanced expression of *Pgβglu-1* following induction in controlled conditions. Our data indicated that the regulation of the *Pgβglu-1* gene and accumulation of the biologically active acetophenones are strongly dependent on phenology. Our findings relating to temporal accumulation are to be expected for a resistance trait under selection given the thousands of years of co-evolution between the insect and its host. There are few examples documenting such a specific and closely related relation between a single gene, biologically active compounds and a pest.

There is uncertainty about the effects of current and future climate changes on boreal species such as spruces and firs in regard to interactions with the SBW, especially during outbreaks. Temperature has been shown to be one of the main factors influencing budburst and early spring phenology (Canell & Smith, 1983; Fu & al, 2012; Hannerz, 1999, Morecroft & Keith, 2009). It is reasonable to think that temperature also plays a major role in the activation of the process which results in accumulation of piceol and pungenol. If that is the case, then climate variation could have impacts on the interaction between spruce and fir host and their pests including SBW.

The SBW, like many insects, depends on temperature to initiate emergence from postdiapause state (Régnière, 1990; Tauber & al., 1986) which means that the phenology of resistant trees may remain synchronized with the life cycle of the insect even through

temperature changes. However, these considerations remain speculative as they pertain to a complex interaction and its reaction to global changes. A recent study established a strong link between outbreak duration and April–May accumulation of degree-day, and between outbreak severity and maximum temperatures of those two months (Gray, 2013). Another study predicted an increase of areas affected by SBW in Ontario for each of the six climate change scenarios that were considered (Candau & Fleming, 2011). Furthermore, it has been shown that insect pests often have traits that are associated with favorable response to climate change (Pelini & al, 2009). Taken together, these studies indicate that regional warming, cooling or variation of weather patterns are likely to impact upon future outbreaks but their magnitude and consequences are very difficult to predict. Recent research on naturally occurring SBW resistance (Daoust et al., 2010; Desplands et al., 2011; Delvas et al., 2011) and the findings reported here indicate that intraspecific variability in SBW hosts must also be factored into predictive models. Future research may provide key information such as geographic patterns in natural resistance that could further inform model developers and forest managers.

Recent increases in SBW defoliation indicate that another widespread SBW outbreak is emerging in eastern Canada. Reports for the province of Quebec are that 3 206 024 ha of forest were severely defoliated in 2013 (71 to 100 % of year foliage loss) (Ministère des ressources naturelles, 2013). Considering the economic impacts of SBW defoliation, the recent reports of increasing affected areas and anticipated impacts that climate changes may have on insects, exploitation naturally occurring resistance mechanism against spruce budworm may become a significant means to better protect and manage forests resources.

Concluding remarks

This study provides support for the hypothesis that the expression of the *Pgβglu-1* gene is a key determinant of acetophenone-based SBW resistance. Some questions, however, remain unanswered. We do not know how common resistance to SBW based on the *Pgβglu-1* gene is in the white spruce population. The nature of the mutation, gain or loss of function, responsible for the two phenotypic classes described here is also unknown. Since this discovery has potential for tree defense against SBW, whether or not it is specific to white spruce also needs to be answered to determine if these findings yield value for other SBW hosts. Finally, the mechanisms by which resistance is passed on to progeny remain unclear but are of great importance for future applications in tree breeding.

Future studies should sample white spruce from other locations throughout its range to determine the frequency and distribution patterns of the resistant phenotype. Research on genomic variations between R and N-R trees could also result in the finding of markers able to discriminate the trees. Such markers could help in quickly identifying the phenotype of a tree and even seedling. We showed that quantification of *Pgβglu-1* expression could be used to determine the phenotype of a tree. However, expression levels vary during the season which can complicate the phenotyping. DNA and chemical (e.g. acetophenones levels) markers could accelerate the process.

Acknowledgments

The authors thanks Sébastien Caron, Patrick Lenz, Mebarek Lamara and André Gagné for technical assistance and sampling as well as Marc Mazerolle for help with statistical analysis.

Funding was received from Genome Canada, Genome Quebec, FQRNT and NSERC. The project was realized as a part of the SMarTForests project.

Chapitre 3 – Principales conclusions et analyses critiques

Cette étude avait pour but de caractériser un gène et d'étudier son rôle dans un phénomène de résistance contre la TBE chez l'épinette blanche. Nos expériences ont montré que l'expression différentielle de *Pgβglu-1* entre les arbres appartenant à deux classes phénotypiques, soient résistants et non-résistants pouvait être transmise à la progéniture et amplifiée via l'induction. Le synchronisme temporel entre l'expression génique, l'accumulation de picéol et pungéol et le stade larvaire le plus vorace de la TBE appuie aussi le rôle du gène dans la résistance contre l'insecte ainsi que le contrôle génétique de la synthèse d'acétophénones actives. Nos résultats indiquent aussi la nature constitutive de la résistance et révèlent un lien très étroit entre la phénologie des arbres résistants et le cycle de vie de la tordeuse. La totalité de l'unité de transcription de *Pgβglu-1* a été obtenue pour les arbres appartenant aux deux classes phénotypiques mais aucun polymorphisme discriminant n'a été trouvé dans la séquence étudiée. Cela suggère que les mécanismes moléculaires impliqués se trouvent peut-être dans les régions flanquantes ou bien dans des loci indépendants (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010; Miele & Dekker, 2008). La récente découverte du phénomène de résistance, les pertes économiques importantes et les perturbations naturelles de grande envergure liées à la tordeuse ainsi que la recrudescence de l'insecte dans l'est du pays (Ministère des ressources naturelles, 2013) expliquent l'intérêt de ce projet.

Les résultats que nous avons obtenus sont concluants, toutefois certains aspects expérimentaux mériteraient à être optimisés pour augmenter la portée des conclusions. Tout d'abord, en débutant l'échantillonnage des arbres matures plus tôt en saison de croissance

(figure 2.4) nous aurions pu déterminer si l'expression du gène commençait au même niveau entre les deux classes phénotypiques ou si le niveau de base des arbres résistants restait plus haut toute l'année. Quelques échantillonnages de plus durant le mois de juin aurait aussi permis de dresser un profil d'expression plus précis. La précision autour de la date à laquelle le pic d'expression est observé aurait été plus grande et la période nécessaire pour une telle augmentation de l'expression aurait pu nous renseigner sur le synchronisme.

En ce qui concerne l'expérience d'héritabilité (voir figures 2.2 et 2.3), les semis sélectionnés l'ont été de manière aléatoire sans tenir compte de la mère sauf pour s'assurer qu'il y avait bien quatre arbres-mères résistantes et quatre non-résistantes. Il aurait été informatif de sélectionner les semis des arbres-mères étudiés dans l'étude de fluctuation saisonnière (figure 2.4). Une étude sur l'expression de *Pgβglu-1* chez les semis par rapport à celle des arbres-mères aurait pu être réalisée et aurait confirmé la transmissibilité du trait.

L'étude sur l'induction du gène aurait pu être réalisée sur un plus grand nombre de familles, comme pour celle sur la transmissibilité. Le portrait dressé aurait potentiellement été plus représentatif et plus informatif sur la réponse à l'induction en fonction du phénotype maternel. Nos résultats montrent qu'il y a une réponse variée entre individus et familles mais il est difficile d'en tirer des conclusions claires sur l'inductibilité du gène étant donné le petit nombre de familles étudiées.

Analyses complémentaires

Les analyses présentées dans ce mémoire étaient principalement exploratoires et ciblaient les questions jugées essentielles à l'avancement du projet. Avec les résultats

obtenus, nous pouvons maintenant élargir l'envergure des recherches et approfondir les aspects importants qui pourraient faciliter l'utilisation de la résistance naturelle pour la protection des forêts et ressources. Quelques pistes sont proposées ici.

Tout d'abord, étant donné l'échantillonnage restreint qui ne couvrait qu'une vingtaine d'arbres dans une plantation, il serait intéressant d'inclure des épinettes blanches d'autres régions du Québec afin de déterminer si le cas de la plantation du sud du Québec est unique. Advenant le cas où que le phénomène de résistance impliquant le gène *Pgβglu-1* est observable dans d'autres plantations et forêts du Québec, il faudra établir la proportion d'arbres résistants et si les niveaux d'expression du gène et d'accumulation des acétophénones actives mesurées sont semblables.

Le débourrement et la phénologie printanière sont majoritairement influencés par les températures des mois de mars, avril et mai (Canell & Smith, 1983; Fu & al, 2012; Hannerz, 1999, Morecroft & Keith, 2009). La TBE, comme plusieurs insectes, dépend aussi de la température pour sortir du stade de postdiapause (Régnière, 1990; Tauber & al, 1986). Étant donné l'implication des températures printanières dans les deux cas on pourrait supposer que peu importe la localisation, le synchronisme entre l'insecte et les arbres résistants est conservé. Il serait donc intéressant de confirmer si les observations réalisées dans le sud du Québec s'appliquent à d'autres latitudes. Ces expériences permettront d'établir l'importance du phénotype résistant et les variations de l'interaction insecte/hôte dans les différentes populations d'épinettes blanches du Québec.

Si la résistance s'avère être un trait répandu chez les épinettes blanches du Québec, l'étude des autres membres du genre *Picea* et *Pinus* serait pertinente. L'accumulation de picéine, picéol et pungénine a déjà été documentée dans certaines espèces appartenant à ceux-ci (Witzell & Martin, 2008; Münzenburger, 1990; Lokke, 1989). La résistance aux coléoptères xylophage chez les conifères est un phénomène bien documenté et implique généralement différents terpénoïdes (Klepzig & al, 1996; Raffa & Smalley, 1995; Bohlmann, 2012). En revanche, les cas de résistance contre les défoliateurs sont moins bien connus. Élargir nos résultats à d'autres espèces qui souffrent de défoliation liée à la TBE nous permettrait d'évaluer si les acétophénones glycosylés sont présentes chez celles-ci, mais surtout si l'aglycone, toxique pour l'insecte, peut être produite.

Nos résultats montrent maintenant que le gène *Pgβglu-1* est bel et bien présent chez les arbres N-R et qu'aucune différence dans la séquence codante ne peut expliquer les deux classes phénotypiques. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches des mécanismes génétiques impliqués dans la résistance et des différences observables dans le génome. Le promoteur du gène *Pgβglu-1* constitue une région du génome pouvant être la cible des prochaines expériences. Le promoteur est une séquence flanquante du gène dont le rôle est d'assurer la régulation de l'expression (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010) et la présence de polymorphismes dans cette région a déjà été liée à des niveaux d'expression différentielle, et ce, chez plusieurs espèces (Yu & al, 2001; Bélanger & al, 2005; Zhang & al, 2008).

La différence d'expression observée entre les arbres résistants et non-résistants pourrait aussi être associée à une différence du nombre de copies du gène *Pgβglu-1*.

Cependant, un contraste d'expression de 773 semble plus grand qu'attendu pour un simple effet de dose qui est généralement le cas lorsque le nombre de copies du gène est responsable de l'expression différentielle observée (Woodwark & Bateman, 2011; Perry & al, 2007). Ultiment, la compréhension des mécanismes génétiques qui entrent en jeu dans la résistance pourrait aider à mieux tirer profit de la découverte. Cela nous permettrait aussi de mieux comprendre le mode de transmission héréditaire de la résistance.

Perspectives et applications pratiques

Les résultats obtenus dans cette étude donneront possiblement lieu à des retombées dans le domaine de la lutte intégrée contre la TBE. Des épinettes blanches sélectionnées pour leur croissance rapide et leur production de biomasse élevée sont plantées sur plusieurs milliers d'hectares chaque année. Des études ont montré que les aiguilles ayant une haute qualité nutritive réduisent l'efficacité des traitements au *B.t.* et par le fait même augmentent les coûts liés à la protection des arbres (Bauce *et al.* 2002). Une des applications les plus prometteuses serait la production de semis possédant le phénotype résistant. Un grand nombre de traits importants pour l'amélioration génétique sont influencés par une multitude de gènes impliqués dans des processus indissociables et ayant chacun un petit rôle dans la détermination du phénotype (Bradshaw & Stettler, 1996). Par exemple, la résistance au dendroctone du pin chez le pin tordu (*Pinus contorta*) est un caractère quantitatif (Yanchuk et al et al & al, 2006). Cela complexifie parfois la tâche lors de la sélection de ces traits pour l'amélioration.

Dans le cas de la résistance contre la TBE, un seul gène joue un rôle majeur ayant pour effet de simplifier les processus éventuels de sélection d'arbres résistants, bien que ce

ne soit pas le seul facteur associé à la résistance. L'épinette blanche fait aussi déjà partie d'un programme d'amélioration génétique, il serait donc d'un intérêt indéniable d'étudier les arbres dont la provenance est connue afin d'établir si certains produisent les acétophénones actives. Si c'est le cas, des études d'héritabilités plus approfondies pourraient être réalisées puisque les arbres utilisés comme parents sont connus. Dans l'éventualité où le phénotype résistant serait déjà présent dans le programme d'amélioration génétique de l'épinette blanche, cela faciliterait les démarches pour obtenir des semis résistants à la tordeuse sans recommencer le processus de sélection au complet. Bien que nos connaissances sur l'héritabilité et les mécanismes en jeu devront être approfondies, les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont prometteurs en ce sens.

Enfin, trouver des différences diagnostiques reliées au niveau de résistance pourrait permettre d'identifier des marqueurs associés à la résistance qui serviraient à déterminer le phénotype des arbres rapidement. Notre étude montre que les niveaux d'expression du gène *Pgβglu-1* permettraient de déterminer le phénotype de résistance des arbres lorsqu'ils ne sont pas sous attaque de la TBE. Comme le niveau d'accumulation de transcrits varie beaucoup durant l'année le phénotypage est plus complexe. L'utilisation de marqueurs simples d'utilisation accélérerait les démarches d'identification et leur l'application sur des semis encore très jeunes raccourcissant la sélection pour la résistance

Littérature citée

Alfaro R I, Borden J H, Fraser R G, Yanchuk A D. (1995) The white pine weevil in British Columbia: Basis for an integrated pest management system, *The forestry chronicle*. 71: 66-73.

Alfaro R I, He F, Kiss G, King J N, Yanchuk A D. (1996) Resistance of white spruce to white pine weevil: development of a resistance index, *Forest Ecology and Management*. 81: 51-62.

Alfaro R I, King J N, Brown R G, Buddingh S M. (2008) Screening of Sitka spruce genotypes for resistance to the white pine weevil using artificial infestations, *Forest Ecology and Management*. 255: 1749–1758.

Bailey J D, Harrington C A. (2005) Temperature regulation of bud-burst phenology within and among years in a young Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantation in western Washington, USA, *Tree Physiology*. 26: 421-430

Barbosa P, Letourneau D, Agrawal A. (2012) *Insect Outbreaks Revisited*, John Wiley & Sons. 492 p.

Beaulieu J. (1996) Programme et stratégie d'amélioration génétique de l'épinette blanche au Québec, Service canadien des forêts. 26 pages.

Bélanger H, Beaulieu P, Moreau C, Labuda D, Hudson T J, Sinnott D. (2005) Functional promoter SNPs in cell cycle checkpoint genes, *Human Molecular Genetics*. 14: 2641-2648

Berenbaum M R, Zangerl A R. (1998) Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 95: 13743-13748

Blais J R. (1957) Some relationships of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (clem.) to black spruce, *Picea mariana* (moench) voss. *The forestry Chronicle*. 33: 364-372

Blais J R. (1983) Trends in the frequency, extent and severity of spruce budworm outbreaks in eastern Canada, *Can. J. For. Res.* 13: 539–547.

Boeckler G A, Gershenzon J, Unsicker S B. (2011) Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses, *Phytochemistry*. 72: 1497-1509.

Bohlmann J. (2012) Pine terpenoid defences in the mountain pine beetle epidemic and in other conifer pest interactions: specialized enemies are eating holes into a diverse, dynamic and durable defence system, *Tree Physiology*. 32: 943-945

- Bowles D. (1990) Signals in the wounded plant, *Nature*. 343: 314-315
- Bravo A, Gill S S, Soberón M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon Journal*. 49: 423-435
- Broekgaarden C, Snoeren T A L, Dicke M, Vosman B. (2011) Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes, *Plant Biotechnology*. 8: 819-825
- Candau J N, Fleming R A. (2011) Forecasting the response of spruce budworm defoliation to climate change in Ontario, *Canadian Journal of Forest Research*. 41: 1948-1960
- Cannell M G R, Smith R I. (1983) Thermal time, chill days and prediction of budburst in *Picea sitchensis*, *Journal of Applied Ecology*. 20: 951-963
- Carisey N, Bauce E. (1997) Impact of balsam fir foliage age on sixth-instar spruce budworm growth, development, and food utilization, *Canadian Journal of Forest Research*. 27 : 257-264.
- Chen Z, Clancy K M, Kolb T E. (2003) Variation in Budburst Phenology of Douglas-fir Related to Western Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae) Fitness, *Journal of Economic Entomology*. 96 :377-387.
- Clancy K M, Chen Z, Kolb T E. (2002) Foliar nutrients and induced susceptibility: genetic mechanisms of Douglas-fir resistance to western spruce budworm defoliation, *Canadian Journal of Forest Research*. 34 :939-949.
- Coulombe G, Huot G, Arsenault J, Bauce E, Bernard J-T, Bouchard A, Liboiron M A, Szaraz G. (2004) Commission d'étude sur la gestion de la forêt publique québécoise.
- Cusson M, Pureswaran D, Régnière R. (2012) La tordeuse des bourgeons de l'épinette, la recherche au centre de foresterie des laurentides de ressources naturelles Canada. 16p
- Delvas N, Bauce E, Labbé C, Ollevier T, Bélanger R. (2011) Phenolic compounds that confer resistance to spruce budworm, *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 141 : 35-44.
- Direction de la protection des forêts, Ministère des ressources naturelles. (2013) Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2013 Version 1.0. 19p
- Eveleigh E S, McCann K S, McCarthy P C, Pollock S J, Lucarotti C J, Morin B, McDougall G A, Strongman D B, Huber J T, Umbanhowar J, Faria L D B. (2007) Fluctuation in density of an outbreak species drive diversity cascades in food webs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 16976-16981

- Farmer E E, Ryan C A. (1990) Interplant communication – Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase-inhibitors in plant leaves, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 7713-7716
- Fleming R A, Candau J N. (1998) Influences of Climatic Change on Some Ecological Processes of an Insect Outbreak System in Canada's Boreal Forests and the Implications for Biodiversity, *Environmental Monitoring and Assessment*. 49: 235-249
- Fleming R A. (2000) Climate change and insect disturbance regimes in Canada's boreal forests, *World Resource Review*. 12: 520-554
- Forestry innovation investment, Government of British-Columbia. (2012) Naturally wood. <http://www.bcfii.ca/>
- Fournier C, Bauce E, Dupont A, Berthiaume R. (2010) Wood losses and economical threshold of Btk aerial spray operation against spruce budworm, *Pest management science*. 66: 319-324.
- Freeman B C, Beattie G A. (2008) An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores, *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01
- Fu Y H, Campioli M, Deckmyn G, Janssens I A. (2012) The Impact of Winter and Spring Temperatures on Temperate Tree Budburst Dates: Results from an Experimental Climate Manipulation. *PLoS ONE* 7(10)
- Germain H, Lachance D, Pelletier G, Fossdal C G, Solheim H, Séguin A. (2012) The expression pattern of the *Picea glauca* Defensin 1 promoter is maintained in *Arabidopsis thaliana*, indicating the conservation of signalling pathways between angiosperms and gymnosperms, *Journal of Experimental Botany*. 63: 785-795
- Grattapaglia D, Bertolucci F L G, Penchel R, Sederoff R R. (1996) Genetic Mapping of Quantitative Trait Loci Controlling Growth and Wood Quality Traits in *Eucalyptus grandis* Using a Maternal Half-sib Family and RAPD Markers, *Genetics*. 144: 1205-1214
- Gray D R. (2013) The influence of forest composition and climate on outbreak characteristics of the spruce budworm in eastern Canada, *Canadian Journal of Forest Research*. 43: 1181-1195
- Hammerschmidt R. (2005) Phenols and plant–pathogen interactions: The saga continues, *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66: 77-78
- Hannerz M. (1999) Evaluation of temperature models for predicting bud burst in Norway spruce, *Canadian Journal of Forest Research*. 29: 9-19
- Hans Lokke. (1989) Picein and Piceol Concentrations in Norway Spruce, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 19: 301-309.

- Harborne, J B. (1980) Plant Phenolic, *Encyclopedia of Plant Physiology*. 8: 329-402.
- Hardy Y J, Lagond A, Hamel L. (1983) The epidemiology of the current spruce budworm outbreak in Quebec, *Forest Science*. 29: 715-725
- Hill A D, Reilly J P. (2008) Computational Analysis of Glycoside Hydrolase Family 1 Specificities, *Biopolymers*. 89.
- Jones P, Vogt T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers, *Planta*. 213: 164–174.
- Juven-Gershon T, Kadonaga J T. (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery, *Developmental Biology*. 339: 225-229
- Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardanelli S, Denno R F. (2008) Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and below-ground plant tissues, *Ecological Society of America, Ecology*. 89: 392-406.
- Kessler A, Baldwin I T. (2002) Plant Response to Insect Herbivory, the emerging molecular analysis, *Plant Biology*. 53: 299-328.
- Kevan P G. (1975) Forest application of the insecticide fenitrothion and its effect on wild bee pollinators (Hymenoptera: Apoidea) of lowbush blueberries (*Vaccinium SPP.*) in Southern New Brunswick, Canada, *Biological Conservation*. 7: 301-309
- Klepzig K D, Riba J M, Smalley E B, Raffa K F. (1996) Combined chemical defenses against an insect–fungal complex, *Journal of Chemical Ecology*. 22:1367–1388
- Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution, *BioEssays*. 16: 123-132
- Kraus C, Spiteller G. (1997) Comparison of phenolic compounds from galls and shoots of *Picea glauca*, *Phytochemistry*. 44: 39-47.
- Kucera D, Orr P. (1980) *Spruce Budworm in the Eastern United States*, U.S. Department of Agriculture.
- LandOwner Resource Centre, Sir Sandford Fleming College and the Ontario Ministry of Natural Resources. (1995) *White Spruce, Extension Notes*. http://www.lrconline.com/Extension_Notes_English/pdf/wht_sprce.pdf
- Li L, Steffens J C. (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance, *Planta*. 215: 239-247
- Mark D. Rausher. (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies, *Nature*. 411: 857-864

McConn M, Creelman R A, Bell E, Mullet J F, Browse J. (1997) Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis (jasmonic acid/wounding signaling), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94: 5473-5477

McDowell J A, British Columbia Ministry of Forests. The ecology of the white and black spruce zone. <http://www.for.gov.bc.ca/hfd/pubs/docs/bro/bro49.pdf>

McLeese D W, Zitko V, Metcalfe C D, Sergeant D B. (1980) Lethality of aminocarb and the components of the aminocarb formulation to juvenile atlantic salmon, marine invertebrates and a freshwater clam, Chemosphere. 9: 79-82

Miele A, Dekker J. (2008) Long-range chromosomal interactions and gene regulation, Molecular BioSystems. 4: 1046-1057

Miinzemberger B, Heilemann J, Strack D, Kottke I, Oberwinkler F, (1990) Phenolics of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce, Planta. 182: 142-148.

Miller B, Madilao L L, Ralph S, Bohlmann J. (2005) Insect-Induced Conifer Defense. White Pine Weevil and Methyl Jasmonate Induce Traumatic Resinosis, de Novo Formed Volatile Emissions, and Accumulation of Terpenoid Synthase and Putative Octadecanoid Pathway Transcripts in Sitka Spruce, American Society of Plant Biologists. 137: 369-382

Morant A V, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette S M, Sanchez-Pérez R, Møller B L, Bak S. (2008) β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense, Phytochemistry. 69: 1795-1813

Nealis V G, Régnière J. (2004) Insect–host relationships influencing disturbance by the spruce budworm in a boreal mixedwood forest, Revue canadienne de recherche forestière. 34: 1870-1882

Nesom G, United States Department of Agriculture: Natural Resources Conservation Service (2000) White spruce. http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_pigl.pdf

Okada I, Hoshiba H. (1970) A laboratory experiment on some insecticides to honeybee, Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University. 10: 79-85

Perry G H, Dominy N J, Claw K G, Lee A S, Fiegler H, Wener J, Villanea F A, Mountain J L, Misra R, Carter N P, Lee C, Stone A C. (2007) Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation, Nature Genetics. 39: 1256-1260

Pelini S M, Prior K M, Parker D J, Dsurisin J D K, Lindroth R L, Hellman J J, Edited by Letcher T M. (2009) Climate Change and Temporal and Spatial Mismatches in Insect Communities, Climate change observed impacts on planet earth. 494 p.

Vanetten H D, Mansfield J W, Bailey J A, Farmer E E. (1994) 2 classes of plant antibiotics – phytoalexins versus phytoanticipins, *Plant Cell*. 6:1191–1192

Price D T, Apps M J. (1995) The boreal forest transect case study: Global change effects on ecosystem processes and carbon dynamics in boreal Canada, *Water Air and Soil Pollution*. 82: 203-214

Raffa K F, Smalley E B. (1995) Interaction of preattack and induced monoterpene concentrations in conifer defense against bark beetle–microbial complexes, *Oecologia*. 102: 285–295

Raherison E, Rigault P, Caron S, Poulin P-L, Boyle B, Verta J-P, Giguère I, Bomal C, Bohlmann J, MacKay J. (2012) Transcriptome profiling in conifers and the PiceaGenExpress database show patterns of diversification within gene families and interspecific conservation in vascular gene expression, *BMC Genomics*. 434.

Réginière J. (1990) Diapause termination and changes in thermal responses during postdiapause development in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*, *Journal of Insect Physiology*. 36: 727-735

Ressources Naturelles Canada. (2011) White spruce, Trees, insects and diseases of Canada's forests. <http://tidcf.nrcan.gc.ca/trees/factsheet/38>

Ressources Naturelles Canada. (2012) Area of forest disturbed by fire, insects, disease and harvesting. <http://cfs.nrcan.gc.ca/pages/276>

Ressources Naturelles Québec, (2012) La tordeuse des bourgeons de l'épinette. <http://www.mrn.gouv.qc.ca/forets/fimaq/insectes/fimaq-insectes-insectes-tordeuse.jsp>

Rigault P, Boyle B, Lepage P, Cooke J E K, Bousquet J, Mackay J. (2011) A white spruce gene catalog for conifer genome analyses, *Plant Physiology*. 157: 14-28

Royama T. (1984) Population dynamics of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*, *Ecological Monographs*. 54: 429-462

Ryan C A, Jagendorf A. (1995) Self-defense by plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 4075

Seo S, Sano H, Ohashi Y. (1997) Jasmonic acid in wound signal transduction pathways, *Physiologia Plantarum*. 101: 740-745

Sharma N, Sharma K P, Gaur R K, Gupta V K. (2011) Role of chitinase in plant defense, *Asian Journal of Biochemistry*. 6: 29-37.

- Strunz G M, Giguère P, Thomas A W, (1985) Synthesis of pungenin, a foliar constituent of some spruce species, and investigation of its efficacy as a feeding deterrent for spruce budworm, *Journal of Chemical Ecology*. 12: 251-260.
- Tauber M J, Tauber C A, Masaki S. (1986) *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press. New York. 411 p.
- Thompson J N. (1994) *The Coevolutionary Process*, University of Chicago Press. 376 p.
- Thomson J D, Plowright R C, Thaler G R. (1985) Matabacil insecticide spraying, pollinator mortality, and plant fecundity in New Brunswick forests, *Revue Canadienne de Botanique*. 63: 2056-2061
- Todesco M, Balasubramanian S, Hu T T, Traw M B, Horton M, Epple P, Kuhns C, Sureshkumar S, Schwartz C, Lanz C, Laitinen R A E, Huang Y, Chory J, Lipka V, Borevitz J O, Dangl J L, Bergelson J, Nordborg M, Weigel D. (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*, *Nature*. 465: 632-636
- Treutter D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review, *Environmental Chemistry Letters*. 4: 147-157
- Urs N V R, Dunleavy J M. (1975) Enhancement of bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds, *Phytopathology*. 65: 686-690
- Valkama E, Koricheva J, Salminen J P, Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, Pihlaja K. (2005) Leaf surface traits overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi?, *Trees*. 19: 191-197
- Wallner W E. (1987) Factors affecting insect population dynamics: Differences between outbreak and non-outbreak species, *Annual Review of Entomology*. 32: 317-340
- Wittstock U, Gershenzon J. (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens, *Plant Biology*. 5: 300-307.
- Witzell J, Martin J A. (2008) Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens — past experiences and future prospects, *Canadian Journal of Forest Research*. 38 : 2711-2727.
- Woodward C, Bateman A.(2011) The Characterisation of Three Types of Genes that Overlie Copy Number Variable Regions, *PLoS ONE* 6(5): e14814. doi:10.1371/journal.pone.0014814
- Yanchuk A D, Murphy J C, Wallin K F. (2008) Evaluation of genetic variation of attack and resistance in lodgepole pine in the early stages of a mountain pine beetle outbreak, *Tree Genetics and Genomes*. 4:171-180.

Yu D, Chen C, Chen Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression, *The Plant Cell*. 13: 1527-1540

Zhanga H, Hea H, Chen L, Lid L, Liang M, Wanga X, Liua Z, Hea G, Chen R, Maa L, Denga X W. (2008) A genom-wide transcription analysis reveals a close correlation of promoter INDEL polymorphism and heterotic gene expression in rice hybrids, *Molecular Plant*. 1: 720-731

Züst T, Heichinger C, Grossniklaus U, Harrington R, Kliebenstein D J, Turnbull L A. (2012) Natural enemies drive geographic variation in plant defenses, *Science*. 338: 116-119