

[NIL-N] Caractérisation de régions chromosomiques pour augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote et la teneur en protéines

Mickaël THROUDE^{1*}, Jacques LE GOUIS², Jérôme SALSE², Caroline PONT², Séverine ROUGEOL², Katia BEAUCHENE³, Jérémy DERORY⁴, Céline DUQUE⁵, Didier TROPEE⁶, Emmanuel HEUMEZ⁷, Alain Chassin⁸, Nadine DURANTON¹, Stéphane LAFARGE¹, Sébastien Praud¹

1 - BIOGEMMA - Centre de Recherche de Chappes 63720 Chappes, France

2 - INRA, UCA - UMR 1095 GDEC - 63039 Clermont-Ferrand, France

3 - Arvalis-Institut du Végétal - 45 Voie Romaine 41240 Ouzouer-le-marché, France

4 - Limagrain Europe - Centre de Recherche de Chappes 63720 Chappes, France

5 - Limagrain Europe - Ferme de l'Etang 77390 Verneuil L'Etang, France

6 - INRA, UPS, CNRS, AgroParisTech - UMR 320 GQE - 91190 Gif sur Yvette, France

7 - INRA - UE 972 GCIE - 80203 Péronne cedex, France

8 - INRA - UE 1375 PHACC - 63039 Clermont-Ferrand, France

* **Coordinateur** : Mickaël THROUDE, mickael.throude@biogemma.com

1. Introduction

Notre projet a été motivé par l'attente de l'agriculture française et européenne de pouvoir répondre aux besoins d'augmentation et d'optimisation de la production des céréales tout en maintenant la qualité des produits, en limitant les coûts de production et en réduisant les effets négatifs sur l'environnement. L'azote est un élément nutritif essentiel qui influence fortement le rendement en grains et la teneur en protéines. Cependant, la production, le transport et l'application des engrais azotés sont très consommateurs d'énergie et le prix de ces engrais est indexé au prix du pétrole. Ainsi le prix des engrais simples azotés a très fortement varié dans les dix dernières années (INSEE). Cela se traduit pour l'agriculteur par un coût équivalent à environ 25-30% des charges opérationnelles. Un des moyens de diminuer ces charges est d'améliorer l'efficacité d'utilisation par la culture et notamment l'efficacité d'absorption. En effet seuls environ 60% de l'azote disponible dans le sol seront absorbés par le blé (Gaju *et al.*, 2011 ; Cormier *et al.* 2016). Une partie est perdue par lessivage entraînant une pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques. Une autre partie est volatilisée sous forme d'oxyde nitreux, un gaz à effet de serre supérieur à celui du gaz carbonique. Ainsi, les engrais azotés seraient responsables tout au long de leur cycle d'environ 50% des émissions de gaz à effet de serre d'origine agricole. Pour limiter ces impacts négatifs, il peut être envisagé une diminution des apports azotés. Mais cela doit se faire tout en maintenant le rendement et la teneur en protéines. Il semble donc essentiel de favoriser la sélection de variétés de blé plus efficace dans leur utilisation de l'azote pour produire du rendement et des protéines.

L'efficacité d'utilisation de l'azote peut être définie comme la quantité de grain produit par unité d'azote disponible pour la plante. Pour tenir compte de la corrélation négative entre production de grain et concentration en protéines, il est intéressant d'utiliser la déviation à la régression linéaire entre ces deux caractères. Monaghan *et al.* (2001) ont proposé ce critère pour la sélection qu'ils ont dénommé GPD, pour *Grain Protein Deviation*.

Il a été montré qu'il existait des différences génotypiques significatives pour les composantes de l'efficacité d'utilisation de l'azote (e.g. Van Sanford et MackKown 1986 ; Fossati *et al.* 1993) et pour le GPD (e.g. Oury et Godin, 2007 ; Bogard *et al.*, 2010). Cela a permis de conduire des études génétiques pour identifier les régions chromosomiques impliquées dans la variabilité observée (Laperche *et al.*, 2007 ; Bogard *et al.*, 2011). Laperche

et al. (2006 ; 2007) ont particulièrement utilisé une population de lignées recombinantes issue du croisement entre les variétés Arche et Recital qui sont contrastées pour leur capacité à utiliser l'azote (Le Gouis *et al.*, 2000). Ainsi, cette population a permis d'identifier 37 régions chromosomiques principales (appelées QTL ou Quantitative Trait Locus) ayant un impact sur l'utilisation de l'azote (Laperche *et al.*, 2007). De son côté, les sociétés Biogemma et Limagrain ont construit une population de type dialléle nommée Metapop et composée de 5 parents élites contrastés pour leur teneur en protéines, composantes du rendement et efficacité d'utilisation de l'azote. Cette population, évaluée de 2005 à 2007 sur 5 lieux et 35 environnements dans le cadre des projets ANR WheatPerformance et WheatGrowth, a permis de mettre en évidence 82 régions chromosomiques d'intérêt pour les caractères étudiés.

En parallèle de ces études conduites sur le blé tendre, des analyses ont été réalisées aux Etats-Unis chez le blé dur pour identifier des régions influençant la concentration en protéines du grain. Un QTL a été identifié sur le bras court du chromosome 6B à partir d'une population de lignées recombinantes (Joppa *et al.*, 1997). Le clonage positionnel du QTL a permis d'identifier un facteur de transcription dénommé *NAM-B1*, responsable du QTL GPC-B1, augmentant la teneur en protéines sans diminuer le rendement (Uauy *et al.*, 2005), ce qui correspond à la définition du GPD. Il a par ailleurs été montré que ce gène accélère la sénescence des feuilles durant le remplissage du grain, augmente la remobilisation d'azote et conduit à une meilleure allocation de l'azote vers le grain (Waters *et al.*, 2009). Par la suite, il a été montré que ce QTL n'est pas seulement associé à une accélération de la sénescence durant le remplissage du grain mais aussi à une accélération du rythme de développement avant floraison (Lacerenza *et al.*, 2010). L'allèle favorable de *NAM-B1* a notamment été utilisé en sélection au Canada pour augmenter la concentration en protéines de blé de printemps (dePauw *et al.*, 2007). Pour cela l'allèle de l'accession israélienne FA15-3 a été transféré au blé hexaploïde Glupro puis à la variété inscrite Lillian, avec une augmentation de concentration en protéines sans effet négatif apparent sur le rendement. Ce gène, qui n'a pas encore été testé dans du matériel de type hiver adapté aux conditions nord-européennes pourrait présenter un intérêt pour améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote.

Enfin, des études australiennes ont montré l'intérêt de limiter l'étendue du tallage dans des situations de déficit en eau. Une réduction du tallage limite le développement foliaire, limite la

transpiration et donc la consommation d'eau qui peut être utilisée plus tardivement durant le remplissage du grain. Pour cela des lignées possédant un allèle limitant le tallage (allèle *R-tin* pour restricted tillering) ont été obtenues à partir de différentes sources. Ainsi en conditions de contraintes hydriques des lignées à faible tallage montraient un rendement supérieur aux variétés classiques (+11%) alors que leur rendement était plus faible en conditions non stressées (Mitchell *et al.*, 2013). Le gène *Tin*, situé en partie distale du chromosome 1A, est capable d'induire une réduction du tallage de plus de 50% (Spielmeyer *et al.*, 2004). Cet allèle pourrait présenter un intérêt dans des systèmes à faible niveau d'azote en permettant une économie d'azote durant la phase pré-floraison qui pourrait se traduire par de plus fortes concentrations en protéines grâce à l'absorption post-floraison.

Une approche couramment utilisée pour étudier ce type de caractère quantitatif est le recours au développement de lignées quasi-isogéniques (NIL pour *Near Isogenic Lines*). En effet le matériel NIL est un outil idéal pour les études génétiques, l'exploration des effets géniques, le criblage de marqueurs moléculaires liés à un locus d'intérêt, l'analyse de son expression et le clonage du gène cible. Depuis les années 90, les NIL ont été largement utilisés pour caractériser et cloner des QTL chez les plantes (Miralles *et al.*, 1997 ; Jonnalat *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces résultats tendent à démontrer l'intérêt de ces régions chromosomiques ou de ces gènes en sélection, pour augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote et la teneur en protéines. Le projet mené de 2014 à 2018 visait à allier les efforts des partenaires du projet (*Biogemma, Limagrain, INRA et ARVALIS*) pour évaluer l'effet des gènes majeurs *NAM-B1* et *Tin*, ainsi que les allèles portés par plusieurs QTL détectés dans les populations recombinantes Arche x Recital et Metapop. Ce travail s'est appuyé sur l'utilisation de matériel isogénique NIL construit en amont et apporté au projet par les partenaires. Le projet a permis d'évaluer l'effet de ces régions et gènes via la mise en place d'un réseau multilocal en champ, comportant différentes stratégies de fertilisation azotée ou de densité de plantes. Les lignées démontrant un impact majeur ont ensuite été expertisées plus finement dans un réseau d'essai plus étendu et représentatif du marché français, visant à mieux évaluer le potentiel des gènes travaillés pour la sélection et tenter d'appréhender les interactions Génotype x Environnement. Enfin, toujours dans l'objectif de faciliter l'utilisation des gènes et du matériel par les sélectionneurs, nous avons caractérisé génétiquement les lignées NIL, évalué la taille des introgressions et développé de nouveaux marqueurs moléculaires pour suivre ces régions.

2. Matériel et méthode

2.1 - Caractérisation écophysologique et agronomique des régions chromosomiques d'intérêt

► Matériel végétal

La validation de l'effet de régions chromosomiques d'intérêt pour augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote et la teneur en protéines a été réalisée par l'évaluation de lignées quasi-isogéniques (NIL) créées en amont du projet. Ces lignées NIL ont été obtenues par au moins trois rétrocroisements successifs du parent donneur (allèle positif) avec des lignées receveuses (NIL BC pour Backcross) ou par autofécondations successives de

lignées hétérozygotes pour l'allèle d'intérêt (lignées NIL HIF pour *Heterogenous Inbred Families*). La construction de ce matériel a été pilotée par l'utilisation de marqueurs moléculaires encadrant les QTL ou les gènes d'intérêt. Quel que soit le type de construction utilisé, une dernière étape d'autofécondation des plantes homozygotes au locus d'intérêt a permis de générer des couples de lignées homozygotes (couples NIL) pour chacun des deux allèles positifs et négatifs. Les évaluations au champ ont été réalisées sur ces couples NIL provenant de 4 populations ou gènes décrits ci-dessous.

Lignées GPC Arche x Recital, 12 couples NIL BC :

Deux QTL ont été identifiées en conditions contrôlées à faible niveau d'azote dans la population Arche x Recital (Laperche *et al.*, 2006). Le QTL sur le chromosome 1B joue sur la longueur racinaire, celui sur le 7A sur la capacité d'absorption d'azote. Les couples étudiés correspondent à ces deux régions chromosomiques, 1B et 7A, pour lesquelles 3 séries de rétrocroisements ont été effectuées dans chacun des fonds parentaux Arche et Recital.

Lignées Metapop, 7 couples NIL BC et 21 couples NIL HIF :

La Metapop est une population de type diallèle incomplet comprenant 551 HD (haploïde doublée) créées à partir de 5 variétés de blé d'hiver élites commerciales : Apache, Aztec, Autan, Cezanne et Uli. Douze QTL influençant le rendement et la teneur en protéine du grain ont été identifiés dans cette population. Ces QTL ont été l'objet de construction de matériel isogénique, 21 couples NIL HIF et 7 couples NIL BC par 3 rétrocroisements dans les fonds Apache ou Cezanne. Les lignées isogéniques sont listées dans le tableau ci-dessous.

QTL	Chrom.	Couples NIL HIF ou NIL BC (grisé)				
Q5	1A	5039_Q5	A P U L_Q5			
Q28	3B	A P A U_Q28	A P A Z_Q28	U L A Z_Q28		
Q29	3B	A P C E_Q29	A P U L_Q29			
Q30	3B	A P A U_Q30	A P A U_Q30_2	A P C E_Q30	A P C E_Q30_2	
Q36	4A	A U A Z_Q36	A U A Z_Q36_4	A U A Z_Q36_3	A Z C E_Q36	A Z C E_Q36_2
Q54	6A	5108_Q54	5150_Q54_2			
Q59	6B	A U C E_Q59				
Q60	6B	5197_Q60				
Q65	6D	5013_Q65	5013_Q65_2			
Q76	7A	A P A U_Q76	A P A U_Q76_3	A P U L_Q76		
Q81	7D	A P A Z_Q81	A P A Z_Q81_2			
Q82	7D	5025_Q82				

Lignées NAM-B1, 12 couples NIL BC :

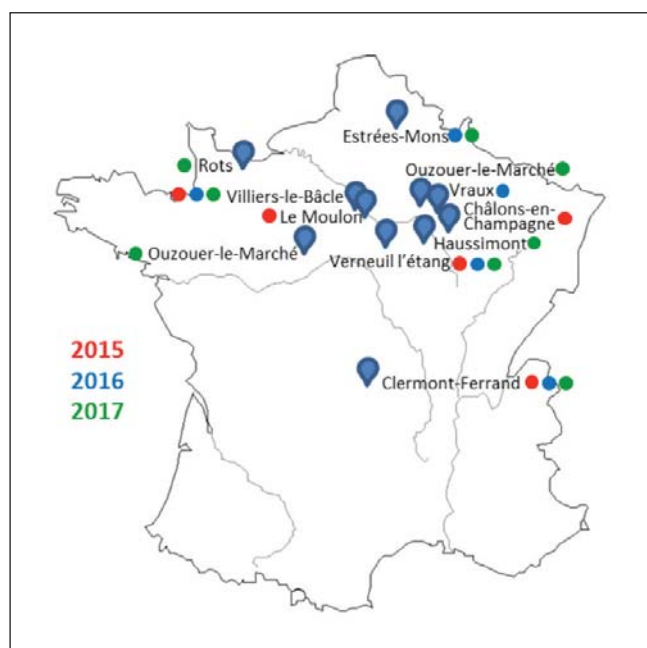
L'allèle favorable du gène *NAM-B1* a été transféré dans quatre fonds génétiques différents : les variétés Premio et Skerzzo qui montrent un écart positif à la relation négative entre le rendement et la concentration en protéines (GPD+) et les variétés Arlequin et Recital qui montrent un écart négatif (GPD-). Trois donneurs ont été utilisés (Yecora Rojo, Kern et Anza) ; un couple isogénique correspondant à une combinaison receveur-donneur. Neuf de ces combinaisons ont été testées (deux couples correspondent à une même combinaison receveur-donneur).

Gène TIN-1A, 3 couples NIL BC :

L'allèle du gène *Tin* associé à la perte de fonction du gène et induisant une réduction du nombre de talles a été introgressé à partir du génotype Oligoculm, dans les 3 fonds génétiques Apache, Caphorn et Korelli.

► Réseau expérimental

Un réseau expérimental de 20 essais en champ a été mis en place entre 2015 et 2017 en France sur 10 lieux (cf. figure ci-dessous).



Chaque couple de lignée isogénique a été évalué sur une, deux ou trois années, avec pour objectif de valider l'effet des QTL et d'évaluer leur potentiel (volet 1), puis d'effectuer une caractérisation écophysiological et agronomique plus fine (volet 2). En fonction des traits travaillés, une partie des essais a visé spécifiquement la caractérisation du tallage et les composantes de rendement en modulant la densité de semis (densité optimale régionale, densité -60% et densité +50%). L'autre partie des essais était focalisée sur les dynamiques d'absorption/remobilisation de l'azote en faisant varier les modalités d'apport azoté (dose bilan X, dose X-80 kg N / ha et sur certains lieux X+80 kg / ha).

Le plan parcellaire utilisé était organisé en sous essais, en fonction de l'origine génétique du matériel (Metapop, Arche x Recital, NAM-B1 et TIN-1A, incluant les témoins parentaux associés), puis par type d'essai (Tallage-rendement ou Azote). Enfin chaque sous essai a fait l'objet d'une randomisation de type « imbriquée totale », c'est-à-dire que la randomisation conservait la proximité des deux lignées d'un couple isogénique.

► Phénotypage

Sur chaque expérimentation, nous avons mesuré le nombre de plantes par m² à la levée (PPA) et le nombre d'épis par m² à maturité (SA) comptés pour les deux mesures sur les mêmes 2 placettes de 2 mètres linéaires, la date d'épiaison (Z55), la hauteur des plantes (PH), le poids spécifique (PS), le rendement à 15 % d'humidité (GY15), le poids de mille grains à 15% d'humidité (PMG) et la concentration en protéines (GPC). A partir de ces variables ont ensuite été calculés le nombre de grains par m² (GPA), le nombre de grains par épis (GPS), le nombre d'épis par plante (SPP) et l'écart à la régression concentration en protéine / rendement nommé GPD. Sur une partie des essais, des variables complémentaires ont été acquises, le stade épi 1 cm (Z30), la longueur et largeur moyennes du grain (GL, GW), l'indice de nutrition azotée à floraison (INN_flo), la durée de sénescence (dursen) et en fonction de leur apparition des notes de verse ou de maladies.

► Analyse des effets

Un script d'analyse des couples NILs a été développé durant le projet. Ce script permet l'automatisation des tests statistiques,

la production de rapports de synthèse et des visualisations graphiques des effets observés (sous forme de graphe radar). Pour chaque lieu et année, les lignées isogéniques ont été analysées couple par couple pour chaque modalité azotée ou densité de semis, puis pour toutes les modalités confondues. Pour chaque variable, nous avons réalisé un test basé sur la méthode Fisher LSD (*Fisher's Least Significant Difference test*) avec une p-value fixée à 5% pour détecter les différences significatives entre les couples isogéniques. L'analyse multi-locale et multi-année a été réalisée à l'aide du package R Metafor (rma.mv) qui permet de caractériser un effet et son risque associé (seuil également fixé à 5%). Lors de ces analyses, les essais présentant des défauts d'implantation (nombre de plantes par m² significativement différents entre lignées lors du test LSD avec une p-value à 5%) ont été exclus.

2.2 - Caractérisation génétique des lignées NIL

► Analyse du fond génétique et de la taille des introgressions

La totalité du matériel végétal isogénique disponible a été génotypée par la méthode GBC (Génotypage par Capture et séquençage). La capture a été réalisée par la technologie « NimbleGen *Sequence Capture* » en phase liquide et le séquençage par Illumina MiSeq par un protocole déjà mis en place par Biogemma. Nous avons utilisé 9 278 marqueurs : 2 723 marqueurs provenant de la puce de génotypage 90K, 3 240 marqueurs provenant de la puce de génotypage Axiom 420K, 3 305 marqueurs Biogemma et 10 marqueurs INRA. Ces marqueurs ont été sélectionnés sur la base de leur répartition homogène sur tout le génome du blé avec un effort de densification de la couverture dans les zones couvertes par les QTL ou gènes suivis.

A partir des informations générées par ces marqueurs, nous avons calculé un index de similarité qui permet d'évaluer le niveau d'homologie au sein de chaque couple isogénique. En parallèle, une visualisation graphique de chaque couple isogénique a été mise en place afin de confirmer l'état d'homogénéité de chaque chromosome mais également de valider la présence des différents QTL dans leur intégralité dans le matériel. Ces visualisations ont été réalisées à l'aide du logiciel Spotfire.

Ancrage physique des régions d'intérêt et développement de nouveaux marqueurs

A partir des marqueurs encadrant les QTL, un ancrage physique a été réalisé sur l'assemblage IWGSC RefSeq V1.0 de la variété de blé hexaploïde Chinese Spring (IWGSC 2018). A partir de cette position physique, il a été possible de sélectionner de nouveaux marqueurs SNP dans plusieurs QTL de la Metapop. Les SNP polymorphes ont été génotypés par la méthode KASPar (KBiosciences, Herts, UK) sur les 551 individus de la population. Les oligonucléotides KASPar ont été dessinés avec le logiciel Primer picker (KBioscience), les amplifications PCR ont été réalisées sur un hydrocycleur (LGC genomics), sur 50 cycles à 57°C et les lectures ont été effectuées sur ABI PRISM 7900 HT.

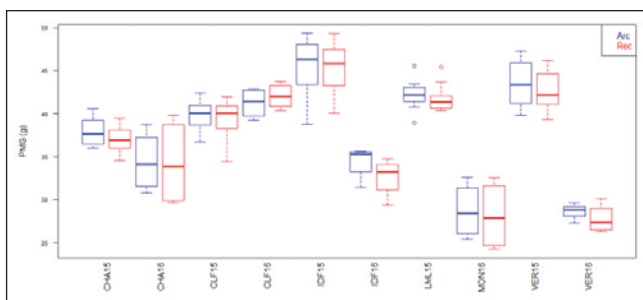
3. Résultats et discussions

3.1 - Caractérisation écophysiological et agronomique des lignées isogéniques

► Caractérisation des lignées GPC, Arche x Recital

Douze couples de lignées isogéniques ont été testés. Ils correspondent à deux régions chromosomiques (1B et 7A) pour lesquelles des rétrocroisements ont été effectués dans chacun des fonds parentaux (Arche et Recital). En 2015, les 12 couples de lignées isogéniques (ARE) ont été implantés dans un réseau de 5

essais à trois doses d'azote. En 2016, quatre couples et les deux parents ont été expérimentés à deux doses d'azote en cinq lieux. Une analyse globale a été réalisée en comparant pour chacune des deux régions chromosomiques, l'effet des deux allèles. Globalement, nous n'observons pas d'effet des deux régions sur le rendement, la concentration en protéines, le nombre de plantes / m², le nombre d'épis par m² et le nombre de grains / m². Pour les deux régions, un effet significatif est observé pour la date d'épiaison et la hauteur des plantes. Pour la région du chromosome 1B, l'allèle provenant de Arche rend les plantes plus tardives (+1.2 j) et plus hautes (+1.6 cm). C'est le contraire pour la région sur le chromosome 7A, l'allèle provenant de Arche rendant les plantes plus précoces (-0.8 j) et plus courtes (-1.8 cm). Enfin, un effet de la région du chromosome 7A est détecté sur le poids de mille grains, l'allèle provenant de Arche l'augmentant de +0.5 g (cf figure ci-dessous).



MON = INRA Estrées-Mons, CHA= Arvalis Châlons, VER= Limagrain Vermeuil, IDF= Arvalis Ile-de-France, CLF = INRA Clermont-Ferrand, LML = INRA Le Moulon, suivi de l'année d'expérimentation.

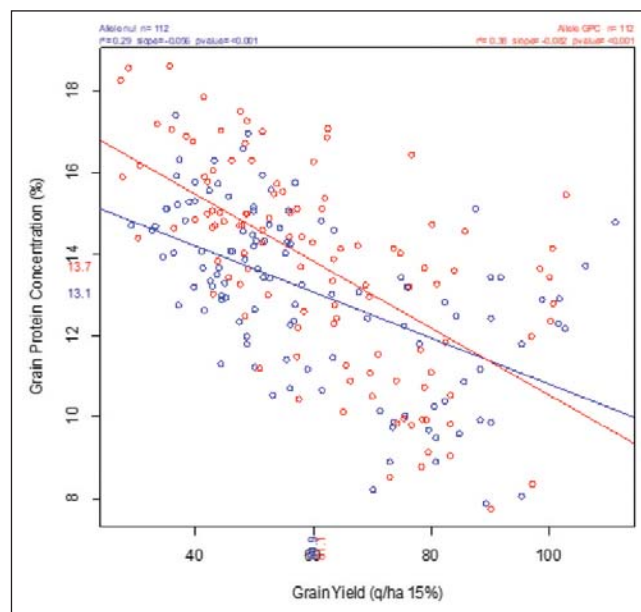
Dans tous les cas, l'effet de l'environnement est très significatif et aucune interaction allèle x environnement n'est mise en évidence.

► Caractérisation des lignées NAM-B1

Dix couples de lignées isogéniques pour la région sur le chromosome 6B contenant *NAM-B1* ont été testés durant le projet. Ils correspondent à quatre fonds parentaux : (i) Arlequin et Récital, deux variétés à faible concentration en protéines (GPD-), (ii) Premio et Skerzzo, deux variétés à forte concentration en protéines (GPD+). En 2016, les 10 couples ont été testés à deux doses d'azote en quatre lieux. En 2017, trois couples ont été testés à une seule dose d'azote (dose bilan) en cinq lieux et un couple a été expérimenté sur la plateforme PhenoField d'Ouzouer-le-marché d'Arvalis à deux niveaux de disponibilité en eau (irrigué et sec) et deux doses d'azote (dose bilan et 0).

Une analyse globale a été réalisée sur les deux années d'expérimentation en considérant chacune des 9 combinaisons receveur-donneur de façon séparée. L'effet de l'allèle est significatif pour le rendement dans 5 combinaisons sur 9. Dans 2 de ces cas (fond Premio), c'est allèle non fonctionnel (nul) qui augmente le rendement, et dans 3 cas (fonds Arlequin et Récital) c'est l'allèle fonctionnel (GPC). L'effet de l'allèle est significatif pour la concentration en protéines dans 8 cas sur 9. Dans tous les cas l'allèle fonctionnel augmente la concentration en protéines. L'interaction entre l'effet de l'allèle et de l'environnement (combinaison année-lieu-traitement) est presque toujours significative (8 cas sur 9) indiquant que l'impact de la région *NAM-B1* dépend fortement du milieu dans lequel elle est testée. Une partie des effets peut provenir en fait de la présence dans les donneurs du gène *Yr36* de résistance à la rouille jaune (Jaury *et al.* 2005), maladie particulièrement marquée en 2016. Il est difficile de conclure sur l'impact du receveur sur l'effet de l'allèle favorable. Mais le plus fort effet sur la teneur en protéines est observé dans le fond Premio (Pre-KE) et le plus faible effet dans le fond Arlequin (Ar1-AZ), un GPD+ et un GPD- respectivement.

En moyenne sur toutes les combinaisons, la différence entre les deux allèles est de +0.2 q / ha pour le rendement et +0.6 % pour la concentration en protéines en faveur de l'allèle fonctionnel (cf figure ci-dessous).



On remarque en tendance, une diminution de l'impact de l'allèle fonctionnel quand le rendement augmente. Ceci pourrait être dû à une limitation de la quantité d'azote remobilisable, quantité sur laquelle l'allèle fonctionnel a un impact. En effet, la quantité supplémentaire qui doit être remobilisée pour augmenter la concentration en protéines de 0.6% à 80 q / ha est supérieure à celle qui doit être remobilisée à 40 q / ha.

L'impact du gène sur les autres caractères est significatif mais faible. Les résultats sont variables en fonction des combinaisons receveur-donneur, mais en moyenne, les lignées possédant l'allèle fonctionnel sont un peu plus précoces à l'épiaison (-1.1 jour), un peu plus courtes (-1.1 cm). Il n'y a pas d'effet moyen sur le PMG.

► Caractérisation des lignées TIN 1A

Trois couples de lignées isogéniques dans les fonds génétiques Apache, Caphorn et Korelli ont été implantés en 2017 dans un réseau de 2 essais à trois doses de semis.

La lignée dans le fond Caphorn a montré dans les deux lieux un très faible niveau de rendement probablement dû à un très bas niveau de tolérance au froid. Elle a été retirée de l'analyse empêchant la caractérisation de l'effet du gène dans ce fond génétique.

L'analyse de variance par lieu montre un effet génotype toujours significatif et un effet densité de semis généralement significatif, sauf pour le rendement. L'effet densité est très fort pour le nombre de plantes et le nombre d'épis, mais les compensations existantes entre ces composantes font que l'effet est moins fort sur le nombre de grains et n'est plus significatif pour le rendement. L'analyse de l'effet de l'allèle dans les deux lieux montre un effet significatif pour l'ensemble des variables à l'exception de la date d'épiaison à Clermont-Ferrand. L'allèle *Tin* limite le nombre d'épis (-76 épis / m² en moyenne) comme attendu et le nombre de grains (-5 195 grains / m²). Il augmente le poids de mille grains et la hauteur des plantes et les rend plus tardives à l'INRA d'Estrées-Mons. L'impact moyen de cet allèle sur le rendement est négatif (-11.3 q / ha) et en contrepartie positif sur la concentration en protéines (+0.7).

Pour plusieurs variables, il existe une interaction de l'effet de l'allèle *Tin* et du fond génétique. Dans tous les cas l'effet de l'allèle *Tin* est plus fort dans le fond Korelli que dans le fond Apache. Par exemple pour le nombre de grains par m², l'allèle *Tin* entraîne une diminution

de 2 907 grains / m² en moyenne pour Apache et de 7 482 grains / m² pour Korelli. Une seule interaction entre l'effet de l'allèle et la densité de semis a été détectée à Estrées-Mons pour le rendement. Dans ce cas, la différence de rendement entre les deux allèles a tendance à être plus faible pour la densité basse (-5.3 q / ha) que pour la densité haute (-10.1 q / ha).

Cette analyse valide dans deux des trois fonds génétiques l'effet fort sur le tallage du gène *T1N1*. Dans les conditions testées, l'effet est négatif sur le rendement mais ce matériel pourra être très pertinent à tester dans d'autres environnements où par exemple un développement végétatif réduit peut être intéressant, par exemple sous contrainte thermique ou hydrique.

► Caractérisation des lignées GPC et composantes du rendement, Metapop

Vingt-huit couples de lignées isogéniques ont été testés entre 2015 et 2017. Ce matériel correspond à 12 régions chromosomiques décrites par des QTL identifiés dans la population Metapop. Sur la base des résultats des essais ainsi que la caractérisation génétique du matériel, 4 couples ont été évalués une seule année puis stoppés, 17 couples ont été évalués durant deux années et 7 durant 3 années. Le tableau ci-dessous présente la répartition des couples isogéniques dans les différents essais : essais de caractérisation agronomique fine (volet2) ciblés sur la remobilisation de l'azote (notés « Azote ») ou sur le tallage et composantes du rendement (notés « Densité ») ou essais d'évaluation du potentiel des QTL effectués dans le volet 1 (notés « volet 1 »).

QTL	Chrom.	Couple NIL	essai 2015	essai 2016	essai 2017
Q5	1A	5039_Q5	Densité		Densité
Q5	1A	APUL_Q5	Densité	volet 1	Densité
Q28	3B	APAU_Q28	volet 1	Densité	
Q28	3B	APAZ_Q28	volet 1	volet 1	Densité
Q28	3B	ULAZ_Q28	Azote	volet 1	
Q29	3B	APCE_Q29	volet 1	Densité	
Q29	3B	APUL_Q29	volet 1	Stop	
Q30	3B	APAU_Q30	volet 1	volet 1	
Q30	3B	APAU_Q30_2	volet 1	Densité	
Q30	3B	APCE_Q30	volet 1	Stop	
Q30	3B	APCE_Q30_2	volet 1	volet 1	
Q36	4A	AUAZ_Q36	volet 1	Stop	
Q36	4A	AUAZ_Q36_4	volet 1	Azote	
Q36	4A	AUAZ_Q36_3	Azote	volet 1	Azote
Q36	4A	AZCE_Q36	volet 1	Stop	
Q36	4A	AZCE_Q36_2	volet 1	volet 1	
Q54	6A	5108_Q54	Densité	volet 1	
Q54	6A	5150_Q54_2	Densité	volet 1	
Q59	6B	AUCE_Q59	volet 1	Azote	
Q60	6B	5197_Q60	Densité	volet 1	Azote
Q65	6D	5013_Q65	volet 1	Densité	
Q65	6D	5013_Q65_2	volet 1	volet 1	
Q76	7A	APAU_Q76	volet 1	Densité	Densité
Q76	7A	APAU_Q76_3	Azote	volet 1	Azote
Q76	7A	APUL_Q76	volet 1	volet 1	
Q81	7D	APAZ_Q81	volet 1	volet 1	Azote
Q81	7D	APAZ_Q81_2	volet 1	Azote	
Q82	7D	5025_Q82	Azote	volet 1	

En 2015, 19 couples de lignées isogéniques ont été évalués, sur un réseau de 5 lieux et trois doses d'azote (volet 1). Une caractérisation plus fine (volet 2) a été effectuée sur 9 couples isogéniques sur un lieu, découpé en deux sous essais faisant varier 2 doses d'Azote ou 3 densités de plantes. Ces 9 couples NIL ont été sélectionnés à partir des résultats d'évaluation menés en 2014 par Limagrain et Arvalis en amont du projet. En 2016, 15 couples ont été évalués sur un réseau de 5 lieux et trois doses d'azote dans le volet 1. Une caractérisation plus fine de 8 couples NIL a été menée dans le volet

2 sur 1 lieu, selon les modalités décrites en 2015, à raison de 5 couples sur l'essai « Densité » et 3 couples sur l'essai « Azote ». En 2017, un réseau plus étendu de 7 lieux nous a permis d'étudier la «pénétrance» de 8 couples NIL, dans différents environnements représentatifs du marché français, et tenter d'appréhender les effets d'interaction Génotype x Environnement aux loci étudiés. Pour les essais « Azote », 4 couples NIL ont été testés à une seule dose d'azote (dose bilan) et 4 répétitions sur 5 lieux ; deux doses d'azote et 3 répétitions sur un lieu et 2 couples NIL sur la plateforme Phenofield d'Arvalis à deux niveaux d'irrigation et deux doses d'azote. Pour les essais « Densité », 4 couples NIL ont été évalués sur 3 lieux, selon 3 modalités de densité de plantes et 3 répétitions ; et sur 3 autres lieux avec deux densités de plantes et 3 répétitions.

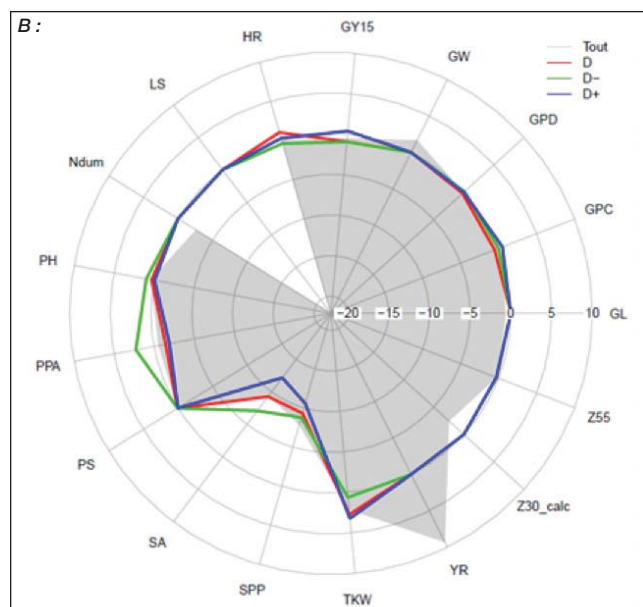
L'analyse des essais a été réalisée par lieu et par année (données non présentées). Les résultats des années 2015 et 2016 nous ont permis de sélectionner les couples isogéniques et QTL les plus prometteurs pour réaliser l'étude de leurs effets dans le réseau d'essai plus large déployé en 2017. L'analyse globale regroupant la totalité des essais réalisées en 2015, 2016 et 2017 a été effectuée à l'aide d'un script développé dans le cadre du projet. Pour chaque couple de lignées isogéniques, une fiche descriptive des effets observés au sein des essais réalisés pour chaque année, pour chaque modalité testée ou toutes modalités confondues, a été produite. A titre d'exemple, la figure présentée page suivante présente la fiche de synthèse du couple isogénique 5039_Q5.

Dans cette fiche, nous pouvons retrouver dans la partie A, le nom du couple isogénique testé (la lignée portant les allèles du donneur 5039_Q5_2.2D contre la lignée isogénique portant les allèles du receveur 5039_Q5_2.5R) ainsi que les effets attendus sur le QTL étudié (le QTL5 qui diminue le nombre d'épis par m² à maturité et augmente le poids de mille grains). Dans le tableau C, nous retrouvons les effets observés pour chacune des variables mesurées en 2015 et 2017 sur les 7 lieux testés pour les modalités de densité optimale (D), réduite (D-) et dense (D+) ainsi que toutes modalités densité confondues (toute_D). Le tableau D, présente les résultats de la méta-analyse, de tous les lieux et années, pour chaque modalité dans l'unité de mesure de chaque trait. Enfin, la figure de la partie B, est une représentation graphique des effets de la méta-analyse dans le sens donneur/receveur, exprimés en pourcentage de la moyenne du trait.

A :

5039_Q5_2.2D Vs 5039_Q5_2.5R

	Indiv	QTL	NIL_name	NIL_type	Donneur_Receveur	Z55	PH	SA	GY	PMG	GPC
11	5039_Q5_2.2D	Q5	5039_Q5	BC	D						
12	5039_Q5_2.5R	Q5	5039_Q5	BC	R				+		+



D:	GL	GPC	GPD	GW	GY15	HR	LS	Ndum	PH	PPA	PS	SA	SPP	TKW	YR	Z30_calc	Z55
NDEN_15ARVvilt_v2tt D	0	-0.2	0	0	-3.41	-0.17	0	0	0.85	7.62	0	-47.62	-0.54	2.36	0	-3.22	-1.33
NDEN_15ARVvilt_v2tt D-	0	-0.43	0	0	-4.37	0.01	0	0	0.35	3.49	0	-37.46	-0.94	-0.02	0	-3.27	-1.67
NDEN_15ARVvilt_v2tt D+	0	0	0	0	-6.09	0	0	0	0.16	-8.03	0	-94.29	-0.3	1.85	0	-0.96	-0.67
NDEN_15ARVvilt_v2tt toute_D	0	-0.21	0	0	-4.63	-0.05	0	0	0.45	1.89	0	-59.79	-0.59	1.4	0	-2.48	-1.22
NDEN_17ARVvilt D	0	0	0	0	1.83	1	-0.93	-0.63	0.8	-26.23	0	-101.57	-0.03	0	0	0	0.67
NDEN_17ARVvilt D-	0	0	0	0	-0.83	-0.37	0	-0.33	0.87	-5.7	0	-58.73	-0.17	0	0	0	-0.33
NDEN_17ARVvilt D+	0	0	0	0	0.5	0.32	-0.47	-0.48	0.83	-15.97	0	-80.15	-0.1	0	0	0	0.17
NDEN_17ARVvilt toute_D	0	-0.17	0	0	-3.08	0	0	0	0.57	6.03	0	-57.47	0	1.47	0	0	-0.33
NDEN_17ARVvilt D-	0	-0.03	0	0	5.07	0.17	0	0	0	7.27	0	-3.8	0	0.7	0	0	-0.33
NDEN_17ARVvilt D+	0	0.13	0	0	3.17	0.03	0	0	0	-14.3	0	-58.7	0	1.53	0	0	-0.33
NDEN_17ARVvilt toute_D	0	-0.02	0	0	1.35	0.07	0	0	0	-0.33	0	-39.99	0	1.23	0	0	-0.33
NDEN_17INRclett D	-0.04	0.6	0	0.07	1.17	0	0	0	0	-39	-2	-70.33	0.13	1.38	0	0	-0.33
NDEN_17INRclett D-	0.01	0.1	0.3	0.08	2.3	0	0	0	-1.67	-35	-5.67	-87.67	0.09	1.29	0	0	0
NDEN_17INRclett D+	-0.03	-0.16	0	0.04	1.5	0	0	0	-1.67	-0.67	0.33	-73	-0.21	1.04	0.33	0	-0.33
NDEN_17INRclett toute_D	-0.02	0.18	0	0.06	1.66	0	0	0	-1.11	-24.99	-2.44	-77	0	1.24	0.11	0	0
NDEN_17INRmont D	0	-0.2	-0.3	0	-1.5	0	0	0	-2.33	-10.33	0.37	-42	-0.08	-0.13	0	0	-0.33
NDEN_17INRmont D-	0	0.03	0.21	0	1.87	0	0	0	1	-21.33	0.43	-71	0.05	0.85	0	0	0
NDEN_17INRmont D+	0	-0.33	0	0	-1.23	0	0	0	0.33	-54.33	-0.2	-61	0.18	-0.06	0	0	0
NDEN_17INRmont toute_D	0	-0.17	-0.04	0	-0.29	0	0	0	-0.33	-28.67	0.2	-58	0.05	0.22	0	0	-0.11
NDEN_17LIMhaut D	0	0.03	0	0	1.43	0.11	0	0	2.67	14.67	-0.1	-60.67	-0.44	1.03	0	0	0
NDEN_17LIMhaut D-	0	0.07	0	0	-8.97	-0.12	0	0	1	18	-0.4	-29	-1.13	0.37	0	0	-0.33
NDEN_17LIMhaut D+	0	0.05	0	0	-3.77	-0.01	0	0	1.83	16.33	-0.25	-44.83	-0.78	0.33	0	0	-0.17
NDEN_17LIMhaut toute_D	0	0	-0.08	0	-0.93	0.02	0	0	0	22	-0.07	-48.33	-0.71	0.97	0	0	-0.67
NDEN_17LIMvert D	0	0.1	0.05	0	-0.5	-0.1	0	0	0.67	7	0.03	6	-0.45	0.73	0	0	-0.33
NDEN_17LIMvert toute_D	0	0.05	-0.01	0	-0.72	-0.04	0	0	0.33	14.5	-0.02	-21.17	-0.58	0.85	0	0	-0.5

C:	GL	GPC	GPD	GW	GY15	HR	LS	Ndum	PH	PPA	PS	SA	SPP	TKW	YR	Z30_calc	Z55
Tout	-0.03	-0.02	-0.05	0.06	-0.48	0	-0.82	-0.39	0.3	-0.96	0.06	-52.53	-0.3	0.91	0.12	-2.22	-0.37
D	-0.06	-0.22	-0.87	0.11	-0.48	0.11	-0.82	-0.39	0.23	-2.93	0.05	-54.65	-0.28	1.14	0.12	-2.22	-0.35
D-	0	0.11	-0.93	-0.04	-0.93	-0.04	-0.93	-0.04	0.72	2.16	0.04	-34.91	-0.49	0.26	0.12	-2.22	-0.42
D+	0.06	0.44	0.03	0.03	-0.48	0.11	-0.82	-0.39	-0.05	-5.03	0.02	-74.07	-0.25	1.48	0.12	-2.22	-0.43

Fiche de synthèse des effets observés au sein du couple de NIL 5039_Q5. Les effets sont exprimés dans le sens donneur vs receveur, les écarts statistiquement significativement différents (seuil de 5%) sont représentés en couleur (effets positifs en rouge et négatifs en vert). A: nom du couple isogénique et effets attendus au QTL. B: radar plot des effets exprimés en pourcents. C: effets observés pour les 7 lieux pour les modalités D-,D,+ et toute_D (toutes modalités).D: effets pour tous les lieux confondus pour les modalités D-,D,+ et Tout (toute modalité).

Les résultats des essais des 7 couples NIL retenus en 2017 ont été synthétisés dans les deux tableaux ci-dessous. Ils présentent l'analyse toute modalité confondue lieu et année, pour les essais « azote » et pour les essais « densité ».

D'une façon générale, nous observons très nettement que les allèles positifs des 4 couples isogéniques évalués sur les essais « azote » induisent une augmentation significative des valeurs GPC et GPD sans altérer le rendement. De la même façon, 3 sur 4 des couples isogéniques évalués sur les essais « densité », démontrent une baisse significative du nombre d'épis par m² ainsi qu'une augmentation du poids de mille grains sans altération du rendement et de la teneur en protéines du grain. De façon plus approfondie, en exploitant tous les résultats des essais réalisés entre 2015 et 2017, nous pouvons caractériser les effets des 6 QTL de tallage et/ou d'efficacité d'utilisation de l'azote étudiés en 2017.

Le QTL5

Ce QTL, situé sur le chromosome 1A, a été étudié via l'utilisation de deux couples de lignées isogéniques évalués

sur l'essai « densité » : le couple NIL BC 5039_Q5 (effet de l'allèle Autan dans le fond Apache) dont les effets ont déjà été décrits ci-dessus et le couple NIL HIF APUL_Q5 (effet de l'allèle Uli3 versus l'allèle Apache). Ces deux couples démontrent un effet significatif du QTL5 sur le tallage avec un effet des allèles Autan et Uli3 qui induisent une réduction de -8% à -10% du nombre d'épis par m² à maturité par rapport à l'allèle Apache, toutes modalités densité de semis confondus. Dans les deux couples, nous pouvons constater que plus la densité de semis est forte, plus l'effet sur le tallage est conséquent (de -13 à -15 % pour la modalité D+). Cette réduction du nombre d'épis par m² induit une augmentation du poids de mille grains (TKW) d'environ +1 gramme, sans induire d'effet négatif significatif sur le rendement et la teneur en protéines du grain (GPC). Cependant, chez les deux couples isogéniques, le rendement et le GPC sont augmentés dans la modalité D+. On peut également noter que dans le couple HIF APUL_Q5, l'allèle de Uli3 induit une augmentation de la hauteur des plantes de +2,7 cm, qui n'est pas observée pour l'allèle Autan.

Couple NIL	GL	GW	GPC	GPD	GY15	PH	SA	SPP	TKW	PS	Z55	dursen	INN_FLO
5197_Q60	-0.12	0.06	0.35	0.70	0.36	7.46	12.76	0.11	1.45	4.05	-0.56	NA	NA
APAU_Q76_3	0.00	0.00	0.33	0.23	0.19	-0.32	11.97	0.20	0.79	0.32	-0.57	-4.47	0.04
APAZ_Q81	0.00	0.09	0.27	0.42	0.44	-0.44	10.40	-0.01	0.56	2.06	-1.64	NA	NA
AUAZ_Q36_3	0.05	0.04	0.35	0.26	0.03	-0.02	-8.41	0.02	1.19	2.19	-1.57	-32.72	-0.04

Synthèse des effets observés au sein des familles isogéniques Metapop « azote » sur tous les lieux, toutes modalités azote confondus pour les variables : longueur et largeur du grain (GL, GW) uniquement évalués sur un lieu (Clermont-Ferrand), concentration en protéines (GPC) et écart à la régression de la relation protéine/rendement (GPD), rendement à 15 % d'humidité (GY15), hauteur des plantes (PH), nombre d'épis à maturité (SA), nombre d'épis par plante (SPP), poids de mille grains (TKW), poids spécifique (PS), stade épi 1 cm (Z30), date d'épiaison (Z55), durée de sénescence (dursen), l'indice de nutrition azotée à floraison (INN_flo). Les effets sont exprimés dans l'unité de mesure des variables, dans le sens de l'effet de l'allèle positif au QTL de la lignée donneuse versus l'allèle de la lignée receveuse. Les effets significativement différents (analyse Metafor, pvalue à 5%) sont en gras, les effets positifs sont surlignés en rouge et les effets négatifs en vert.

Couple NIL	GL	GW	GPC	GPD	GY15	PH	SA	SPP	TKW	PS	Z30	Z55
5039_Q5	-0.04	0.06	-0.02	-0.05	-0.48	0.30	-52.53	-0.30	0.91	0.06	-2.22	-0.38
APAU_Q76	0.02	0.01	0.33	0.32	-0.22	-0.22	-33.66	-0.18	0.59	0.33	-6.74	-1.20
APAZ_Q28	0.11	0.01	0.19	0.18	-0.98	0.56	-5.06	0.00	1.10	-0.18	NA	-0.11
APUL_Q5	0.07	0.03	0.09	0.11	0.92	2.75	-37.03	-0.24	1.41	0.50	2.53	-0.01

Synthèse des effets observés au sein des familles isogéniques Metapop « densité » sur tous les lieux, toutes modalités densité de semis confondus.

Le QTL28

Ce QTL, situé sur le chromosome 3B, a été étudié sur l'essai «densité» par le couple NIL HIF APAZ_Q28 qui permet de mesurer l'effet de l'allèle Aztec (réduction du tallage et augmentation du TKW) versus l'allèle Apache. Ce couple isogénique n'a pas démontré d'effet significatif sur le tallage pour ce QTL. Toutefois, nous démontrons un effet significatif de +3 % sur le TKW pour les modalités D et D+ associé à une augmentation de la teneur en protéines du grain de +1,5 %. L'augmentation du TKW est accompagnée d'une augmentation de la longueur et largeur du grain, cependant nous observons une réduction du rendement d'environ 1 q / ha.

Le QTL76

Ce QTL, situé sur le chromosome 7A, a été étudié à la fois sur les essais «azote» et «densité» via deux couples isogéniques HIF APAU_Q76 et APAU_Q76_3 permettant tous les deux de quantifier l'effet de l'allèle Autan versus l'allèle Apache. Les deux constructions démontrent clairement un effet positif de l'allèle Autan sur le GPC de +3 % et sur le GPD. Ce QTL a un effet positif sur le TKW qui n'est pas corrélé négativement au rendement. Sur la modalité N-, le QTL a un effet moyen sur le rendement de + 1,5 q / ha mais qui n'est pas statistiquement significatif. Il faudrait réaliser davantage d'essais sous conditions d'azote réduit pour confirmer cet effet.

Le QTL60

Ce QTL situé sur le chromosome 6B, a été évalué sur l'essai «azote» via l'utilisation du couple NIL BC 5197_Q60 qui permet d'étudier l'effet de l'allèle Uli3 par rapport à l'allèle Cezanne. L'allèle Uli3 induit une augmentation moyenne de la taille des plantes de + 7,5 cm avec une augmentation du TKW de 1 à 1,7 g, via une augmentation de la taille du grain de + 0,11 mm (la largeur ne semble pas affectée). Pour la modalité azote optimal, l'augmentation du TKW n'induit pas de perte du rendement, de plus nous observons une augmentation des valeurs GPC et GPD. Pour la modalité azote réduit, nous pouvons observer une augmentation du rendement de +1,5 q / ha, accompagnée d'un indice GPD de + 1,06 points.

Le QTL36

Ce QTL est situé sur le chromosome 4A. Il a été évalué sur l'essai «Azote» via l'utilisation du couple NIL HIF AUAZ_Q36_3 qui permet d'étudier l'effet de l'allèle Autan versus Aztec. L'allèle Autan est significativement plus précoce de -1,5 jour et induit une amélioration du TKW et des valeurs GPC et GPD. Cependant, le QTL semble induire une réduction du rendement pour les modalités N et N+ et une amélioration de +4,4 q / ha pour la modalité N-. Il est important de noter que sur les essais de 2016 (année avec forte pression maladie), l'allèle Autan s'est comporté différemment avec une augmentation significative du rendement qui a impacté l'effet positif sur le GPC observé en 2015 et 2017.

Le QTL81

Ce QTL situé sur le chromosome 7D a été évalué sur l'essai «azote» par le couple NIL HIF APAZ_Q81 qui permet d'étudier l'effet de l'allèle Apache versus l'allèle Aztec. Nous observons un effet de l'allèle Apache sur la précocité de -1,6 jours, ainsi que sur le poids spécifique et sur le TKW qui est accompagné d'un effet positif sur le GPC et GPD. Cependant, ces effets s'accompagnent d'une perte de rendement qui est non significative sur l'analyse multi année-lieu-modalité mais qui présente de fortes variations positives et négatives selon les lieux et années testés (fortes interactions génotype x environnement), notamment sur les essais de 2016.

Dans ces six QTL, étudiés au travers de 8 couples de lignées isogéniques, nous avons pu confirmer les effets attendus et caractériser plus finement l'impact de ces locus sur les différentes variables mesurées. Les QTL retenus à l'issue des trois années d'essais démontrent clairement des effets positifs sur le rendement, les composantes du rendement (notamment le tallage et le poids de mille grains) ainsi que des effets sur l'efficacité d'utilisation de l'azote avec des améliorations de la teneur en protéine du grain et de l'indice GPD. Des essais complémentaires ou des réductions des intervalles de confiance pourront s'avérer nécessaires pour certains QTL, en fonction de leur intérêt pour la sélection. Nous avons noté des effets de compensation des variables et des interactions avec l'environnement sur lesquels des analyses complémentaires pourront être effectuées à partir du jeu de données généré.

3.2 - Caractérisation génétique des lignées NIL

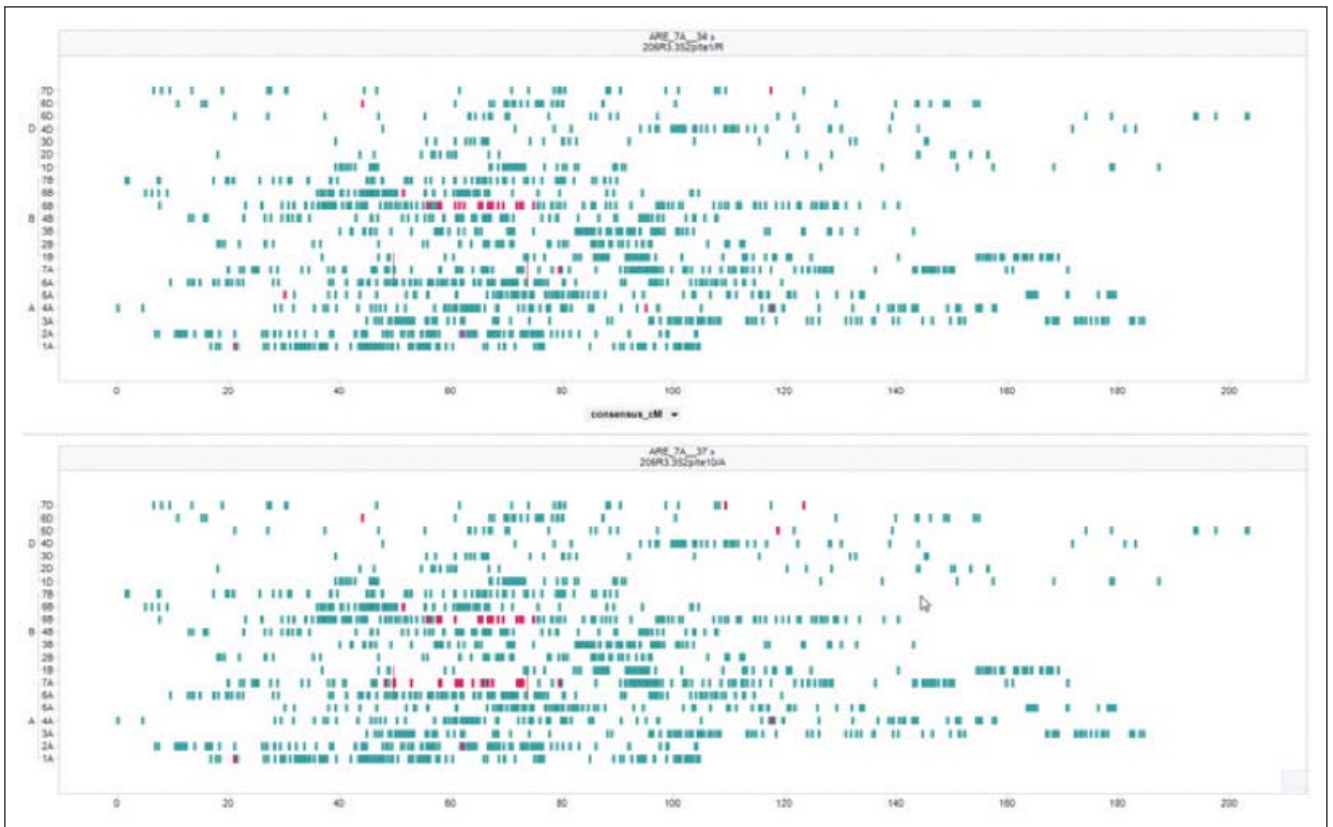
Une caractérisation génétique des lignées isogéniques a été menée afin de contrôler la qualité du matériel construit et de faciliter son utilisation en sélection. Nous avons génotypé 185 lignées NIL ainsi que leurs lignées parentales (47 NIL GPC Arche x Recital, 40 NIL *NAM B1*, 82 NIL Metapop, 16 NIL *TIN1A*). Sur les 9802 marqueurs génotypés par la technique GBC, 9278 SNP (94.7%) se sont avérés polymorphes sur ce matériel. Le nombre de données manquantes est faible avec moins de 1.8% d'échecs. Afin de comparer les couples NIL, les marqueurs ont été ancrés sur le génome. 82.9% des marqueurs (7642 SNP) ont pu être positionnés physiquement sur le référentiel IWGSC RefSeq V1.0 et 72.4 % (6674 SNP) ancrés génétiquement sur la carte consensus INRA, développée dans le projet Breedwheat (Rimbert *et al.*, 2018).

L'analyse des données de génotypage a permis de mesurer la taille des fragments d'intérêt introgressés par rapport à la taille des QTL ciblés. Cette information permet de contrôler l'entraînement de locus portant des allèles négatifs ou inadaptés qui pourraient diminuer, voire annuler l'effet des allèles positifs importés dans les lignées élites. La taille moyenne des fragments introgressés était comprise entre 100% et 150% de la taille de la zone ciblée. Enfin, nous avons évalué la pureté du matériel isogénique en calculant l'indice de similarité des couples NIL BC ou NIL HIF sur la base des marqueurs polymorphes entre les deux lignées parentales des couples. Cette analyse a démontré des niveaux de similarité élevés entre les couples NIL GPC Arche x Recital, *NAM B1* et NIL Metapop avec des variations d'indice compris entre 49.0 % et 99.4 % et une moyenne située à 97.5%. Quatre couples NIL Metapop inférieurs à 85.0% d'identité ont été exclus pour la suite des évaluations. Les lignées NIL *TIN1A* se sont avérées moins bien fixées avec un indice moyen à 55.0% d'identité. Les 3 couples les mieux fixés ont été retenus pour les évaluations agronomiques.

Afin d'identifier plus précisément les chromosomes portant des résidus provenant des lignées donneuses, nous avons réalisé des visualisations graphiques présentant l'homologie des couples NIL (cf. figure ci-contre).

Ce travail a permis, d'orienter au mieux le choix des lignées en vue de leur caractérisation dans le volet 2. A terme, l'identification des nouveaux marqueurs dans les zones d'intérêt pourra être utilisée pour le suivi ou le clonage des QTL. Enfin, les couples isogéniques pourront être retravaillés par les sélectionneurs qui disposeront d'informations et de marqueurs pour suivre les zones présentant des défauts de fixation.

Nous avons initié un travail de réduction des intervalles de confiance de 6 QTL issus de la Metapop, priorisés sur la base



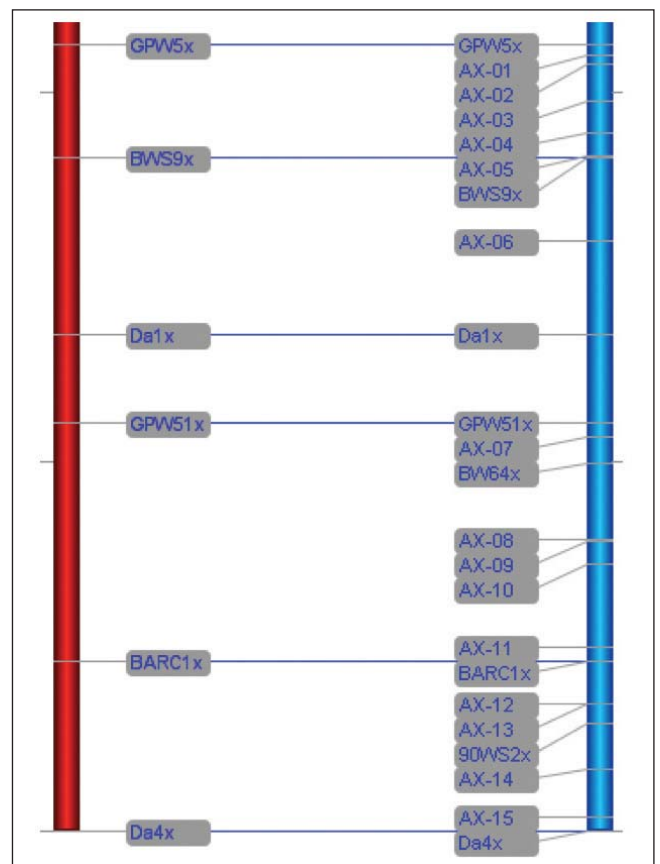
Représentation graphique de l'homologie d'un couple isogénique (exemple d'un NIL sur le QTL 7A Arche x Recital). En haut, la lignée portant les allèles négatifs (Arche) au QTL et en bas la lignée portant les allèles positifs (Recital). En ordonnée, les 21 chromosomes et en abscisse les marqueurs SNP (barres colorées : rouge=allèle Arche ; bleu= allèle Recital). Le QTL est matérialisé par les deux barres verticales rouges sur le chromosome 7A. On peut observer un fragment résiduel de la lignée donneuse Arche sur le chromosome 5B.

des résultats de caractérisation agronomiques des NIL. En effet, bien que ces QTL étaient initialement décrits avec des positions génétiques de quelques dizaines de centimorgans, leur ancrage physique a mis en évidence des zones étendues allant de 24 à 511 Mb. Il est donc apparu pertinent de génotyper de nouveaux marqueurs dans ces QTL en vue d'une nouvelle détection de QTL sur la population d'origine et tenter de réduire les intervalles de confiance. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons sélectionné 168 nouveaux marqueurs SNP en fonction de leur polymorphisme au sein des parents de la population Metapop et de leur répartition homogène au niveau des zones ciblées (tableau ci-dessous).

QTL	Chrom.	Taille (pb)	SNP sélectionnés
QTL_5	chr1A	391100000	59
QTL_28	chr3B	173345000	24
QTL_36	chr4A	24649000	16
QTL_60	chr6B	511668000	25
QTL_76	chr7A	49595000	19
QTL_81	chr7D	42451000	25
		Total :	168

Tableau des 6 QTL sélectionnés pour la densification en marqueurs. De gauche à droite : nom du QTL, chromosome, taille de l'intervalle en paires de bases sur le référentiel Chinese Spring IWGSC RefSeq V0.1, nombre de SNP sélectionnés.

Ces SNP ont été génotypés sur l'ensemble des 551 individus de la population Metapop. La figure ci-contre présente un exemple de résultat de densification en marqueurs sur le QTL81 situé sur le chromosome 7D. Nous constatons que les marqueurs développés combient les zones peu couvertes de la carte initiale (en rouge).



Représentation graphique de la carte physique du QTL81 avant densification en marqueurs (barre rouge) et après (barre bleue). Les liens entre les marqueurs communs des deux cartes sont matérialisés par des traits bleus.

La nouvelle détection de QTL avec la carte enrichie en marqueurs n'a pas été effectuée, mais elle devrait permettre à terme de réduire l'intervalle de confiance de ces 6 QTL. Ce travail peut s'avérer important en vue de potentielles étapes de clonage des QTL ou leur utilisation par les sélectionneurs, en limitant les pollutions alléliques engendrées par l'introgression de zones QTL trop étendues.

4. Conclusions - Perspectives

La collaboration entre Biogemma, Limagrain, INRA et ARVALIS nous a permis d'explorer un large catalogue de QTL et d'accéder à un vaste réseau de plateformes expérimentales. Le projet est également un bel exemple de continuité entre des projets ANR Génoplante, à l'origine de la détection de certains QTL ainsi que de la construction de plusieurs couples NIL. Cette synergie s'illustre également au travers de l'utilisation de ressources produits par le projet d'Investissement d'Avenir ANR BreedWheat (ANR-10-BTBR-03).

D'un point de vue scientifique, bien que des analyses ou expérimentations complémentaires pourraient s'avérer nécessaires dans certains cas, nous sommes parvenus à démontrer des effets significatifs pour plusieurs QTL qui confirment les effets attendus par les loci ou allèles positifs ciblés. Ces objectifs ont pu être atteints grâce à l'utilisation de lignées isogéniques, couplée à la

mise en place d'un réseau d'essais étendu permettant d'étudier différents environnements au travers de combinaisons lieux, années, et modalités de culture. En parallèle, le projet a permis de mettre en place des échanges entre les partenaires sur les dispositifs expérimentaux et les méthodes d'analyse de ce type de matériel.

Le projet a permis de réunir un jeu de données conséquent sur lequel de nouvelles analyses pourront être envisagées pour étudier plus finement les interactions Allèle x Environnement ou encore les phénomènes de compensation entre les variables en utilisant par exemple des modèles de type *path analysis* (Dhungana *et al.* 2007).

Ce projet permet de fournir un catalogue de QTL et de lignées isogéniques susceptibles d'être rapidement exploités dans des programmes de sélection variétale. A titre d'exemple, des lignées isogéniques pour le gène *NAM-B1* ont été choisies et introduites dans le programme de croisements de l'INRA. Les descendants sont en cours d'étude. Le travail de caractérisation génétique des lignées NIL ainsi que la densification en marqueurs de plusieurs QTL, devrait faciliter la valorisation du matériel. Enfin, une publication est envisagée sur l'effet du gène *NAM-B1* sur la concentration en protéines et le rendement en utilisant les données du réseau d'expérimentation du projet.

Références bibliographiques

- Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet JM, Jeuffroy MH, Gate P, Martre P, and Le Gouis J** (2010) Deviation from the grain protein concentration - grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* 61, 4303-4312
- Bogard M, Jourdan M, Allard V, Martre P, Perretant MR, Ravel C, Heumez E, Orford S, Snape J, Griffiths S, Gaju O, Foulkes J, and Le Gouis J** (2011) Anthesis date mainly explained correlations between post-anthesis leaf senescence, grain yield and grain protein concentration in a winter wheat population segregating for flowering time QTL. *Journal of Experimental Botany* 62, 3621-3636
- Cormier F, Faure S, Dubreuil P, Heumez E, Beauchêne K, Lafarge S, Praud S, and Le Gouis J** (2013) A multi-environmental study of recent breeding progress on nitrogen use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 126, 3035-3048
- Cormier F, Foulkes J, Hirel B, Gouache D, Moënne-Locco Y, Le Gouis J** (2016) Breeding for increased nitrogen-use efficiency: a review for wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Breeding* 135:255-278
- DePauw RM, Knox RE, Clarke FR, Wang H, Fernandez MR, Clarke JM, McCaig TN** (2007) Shifting undesirable correlations. *Euphytica* 157:409-415
- Dhungana P, Eskridge KM, Baenziger PS, et al** (2007) Analysis of Genotype-by-Environment Interaction in Wheat Using a Structural Equation Model and Chromosome Substitution Lines. *Crop Science* 47:477
- Fossati D, Fossati A, Feil B** (1993) Relationship between grain yield and grain nitrogen concentration in winter triticale. *Euphytica* 71:115-123
- Gaju O, Allard V, Martre P, Snape J, Heumez E, Le Gouis J, Moreau D, Bogard M, Griffiths S, Orford S, Hubbart S, and Foulkes J** (2011) Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency (NUE) of wheat genotypes. *Field Crop. Res.* 123, 139-152
- Jonnala RS, MacRitchie F, Smail VW, et al** (2010) Protein and Quality Characterization of Complete and Partial Near-Isogenic Lines of Waxy Wheat. *Cereal Chemistry Journal* 87:538-545
- Joppa LR, Du CH, Hart GE, Hareland GA** (1997) Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci* 37:1586-1589
- Lacerenza JA, Parrott DL, Fischer AM** (2010) A major grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 6 influences flowering time and sequential leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 61:3137-3149
- Laperche A, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Gardet O, Hanocq E, Devienne-Barret F, Le Gouis J** (2007) Using genotype x nitrogen interaction variables to evaluate the QTL involved in wheat tolerance to nitrogen constraints. *Theoretical and Applied Genetics* 115:399-415
- Laperche A, Devienne-Barret F, Maury O, Le Gouis J, Ney B** (2006) A simplified conceptual model of carbon and nitrogen functioning for QTL analysis of winter wheat adaptation to nitrogen deficiency. *Theoretical and Applied Genetics* 113:1131-1146
- Le Gouis J, Béghin D, Heumez E, Pluchard P** (2000) Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* 12:163-173
- Miralles DJ, Slafer GA, Lynch V** (1997) Rooting patterns in near-isogenic lines of spring wheat for dwarfism. *Plant and Soil* 197:79-86
- Mitchell JH, Rebetzke GJ, Chapman SC, Fukai S** (2013) Evaluation of reduced-tillering (*tin*) wheat lines in managed, terminal water deficit environments. *J Exp Bot* 64:3439-3451
- Monaghan JM, Snape JW, Chojcecki AJS, Kettlewell PS** (2001) The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high protein concentration and yield. *Euphytica* 122:309-317
- Oury FX, Godin C** (2007) Yield and protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes. *Euphytica* 157:45-57
- Rimbert H, Darrier B, Navarro J, et al** (2018) High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLOS ONE* 13
- Spielmeier W, Richards RA** (2004) Comparative mapping of wheat chromosome 1AS which contains the tiller inhibition gene (*tin*) with rice chromosome 5S. *Theor Appl Genet* 109: 1303-1310
- Uauy C, Brevis JC, Chen XM, Khan I, Jackson L, Chicaiza O, Distelfeld A, Fahima T, Dubcovsky J** (2005) High-temperature adult-plant (HTAP) stripe rust resistance gene Yr36 from *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* is closely linked to the grain protein content locus Gpc-B1. *Theoretical and Applied Genetics* 112:97-105
- Van Sanford DA, MacKown CT** (1986) Variation in nitrogen use efficiency among soft red winter wheat genotypes. *Theor Appl Genet* 72:158-163
- Wang X, Zhang Y, Zhang B, et al.** (2018) Comparison of quality properties between high-molecular-weight glutenin subunits 5 + 10 and 2 + 12 near-isogenic lines under three common wheat genetic backgrounds. *Cereal Chemistry* 95:575-583
- Waters BM, Uauy C, Dubcovsky J, Grusak MA** (2009) Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J Exp Bot* 60:4263-4274