

RémoBlé : améliorer la remobilisation de l'azote pour augmenter la concentration en protéines du blé

Fabien CHARDON^{1*}, Emmanuelle BANCEL², Catherine RAVEL², Anne MARMAGNE¹, Manon LARDOS¹, Céline MASCLAUX-DAUBRESSE¹, Séverine ROUGEOL², Amélie BRESSON², Esther RODRIGUEZ DE HARO², Lilian FAURIE², David ALVAREZ², Sibille PERROCHON², Katia BEAUCHENE⁴, Aida ROUABI⁵, Valérie HERTEMAN⁶, Pierre MARTRE⁵, Pierrick VARENNE⁶, Jean-Charles DESWARTE³, Jacques LE GOUIS²

1 - INRAE - Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), 78000 Versailles

2 - INRAE - Université Clermont-Auvergne, UMR GDEC, 63000 Clermont-Ferrand

3 - ARVALIS - Institut du Végétal, ZA des gravières, Route de Chateaufort, 91190 Villiers-le-Bâcle

4 - ARVALIS - Institut du Végétal, 45 voie Romaine, Ouzouer-le-Marché, 41240 Beauce-la-Romaine

5 - INRAE - Institut Agro/SupAgro Montpellier, UMR LEPSE, 34060 Montpellier

6 - LIMAGRAIN EUROPE - Rue Henri Mondor, 63360 Saint-Beauzire

*Coordinateur du projet : Fabien CHARDON, fabien.chardon@inrae.fr

1 Introduction

Dans un contexte marqué par une demande mondiale croissante en produits céréaliers, l'amélioration des variétés de blé est devenue impérative. Cependant, les avancées en termes de rendement sont souvent accompagnées d'une diminution de la concentration en protéines, orientant l'usage des grains et limitant leur valorisation économique. Ainsi, en moyenne et à fertilisation azotée constante, un progrès génétique de 10 q/ha se traduit par une baisse de 1% en protéines (Oury et Godin, 2007). Parallèlement, les préoccupations environnementales, notamment liées au réchauffement climatique, restreignent l'utilisation de la fertilisation azotée nécessaire à la croissance des cultures, car c'est une source importante d'émission de gaz à effet de serre. Ainsi, la nécessité de comprendre la relation complexe entre le rendement et la concentration en protéines émerge comme un défi majeur pour l'agriculture moderne.

Le projet RémoBlé répond à cet enjeu en se focalisant sur la compréhension fine des mécanismes physiologiques liés au locus spécifique *NAM-B1* (également appelé *GPC-B1*), récemment identifié comme un élément clé influençant la concentration en protéines, sans compromettre le rendement, tout en régulant la sénescence chez un blé sauvage (*Triticum turgidum ssp. dicoccoides*) (Uauy et al 2006a ; Distelfeld et al 2006). Cet effet positif se manifeste notamment à travers un trait de sélection connu sous le nom de GPD (Grain Protein Deviation), qui représente l'écart à la régression négative entre rendement en grain et concentration en protéines (Monaghan et al., 2001). La sénescence et la remobilisation de l'azote chez les céréales jouent un rôle crucial dans la nutrition des plantes et la qualité des grains. La remobilisation de l'azote, qui représente 50-90% de l'azote présent dans le grain à maturité est un processus vital pour assurer un rendement optimal tout en maintenant une teneur en protéines adéquate. Pendant la phase de sénescence, les plantes dégradent l'appareil photosynthétique, libérant ainsi l'azote stocké dans les feuilles et permettant sa remobilisation vers les grains en développement. Une bonne synchronisation de la sénescence avec la remobilisation est essentielle pour garantir un remplissage efficace des grains et

maximiser le potentiel de rendement. Cependant, les mécanismes sous-jacents de la sénescence et de la remobilisation de l'azote restent incomplètement compris.

La cartographie fine du locus *NAM-B1* sur le chromosome 6B a révélé que le gène causal est un facteur de transcription NAC, homologue du gène *AtNAP* d'*Arabidopsis* (Guo et Gan 2006) et du gène *OsNAP* du riz (Liang et al., 2014 ; Chen et al., 2014), décrits comme des régulateurs positifs de la sénescence et qui modifient le rendement et la durée de remplissage des grains. Une copie de ce gène, *NAM-A1*, présente sur le génome A du blé, a également été associée à la régulation de la teneur en protéines (Cormier et al., 2015). Par ailleurs, une autre copie, appelée *GPC-2*, est présente sur les chromosomes du groupe 2 du blé hexaploïde, présentant un profil de transcription similaire à *GPC-B1* (Uauy et al., 2006b). Les niveaux de transcription des différents gènes *NAM* augmentent progressivement pendant la phase de remplissage des grains, suggérant leur implication dans la sénescence. Des études utilisant l'interférence ARN pour réduire les niveaux de transcription de ces gènes ont montré un retard de la sénescence et une diminution de plus de 30% de la teneur en azote, zinc et fer dans le grain (Uauy et al., 2006b). L'allèle fonctionnel de *NAM-B1*, trouvé chez *T. turgidum ssp. dicoccoides*, avait été rapporté comme absent chez le blé tendre (*T. aestivum ssp. aestivum*). Ce n'est qu'en 2012, que Hagenblad et al. (2012) ont rapporté la présence de cet allèle fonctionnel dans seulement quelques ressources patrimoniales.

L'effet positif de *NAM-B1* sur la teneur en protéine des grains a été démontré initialement chez le blé dur, provoquant une augmentation de 10% à 15% (Distelfeld et al ; 2007). L'allèle fonctionnel de *NAM-B1* a déjà été intégré dans des programmes de sélection au Canada pour augmenter la teneur en protéines du blé de printemps (dePauw et al., 2007). Cette stratégie a conduit à une augmentation significative de la concentration en protéines sans observer d'effet négatif notable sur le rendement. Par la suite, d'autres introgressions ont été réalisées dans des pools génétiques adaptés aux conditions des États-Unis d'Amérique (Brevis et Distelfeld, 2010), de l'Inde (Kumar et al., 2011), de l'Argentine (Tabbita et al., 2013), et de



l'Australie (Eagles *et al.*, 2014). Dans toutes ces études, la stratégie d'introggression s'est avérée fructueuse montrant que le locus *NAM-B1* pouvait être utilisé pour améliorer la teneur en protéine, de 5% à 10% selon les géotypes, sans trop affecter le rendement des variétés, bien que l'effet du gène soit parfois modulé par l'environnement. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'appliquer cette stratégie à des lignées adaptées aux conditions nord-européennes.

Rapidement après la découverte de Uauy, l'allèle fonctionnel du gène *NAM-B1* du blé sauvage a été introduit dans des variétés de blé tendre d'hiver spécifiquement adaptées aux conditions françaises. Ce travail a conduit à l'obtention de lignées quasi-isogéniques. Les premières évaluations sur le terrain de ce matériel, dans le cadre du projet FSOV 2014E NIL-N, ont démontré que, en moyenne, l'allèle fonctionnel du locus *NAM-B1* favorise le remplissage des grains en protéines par rapport à son homologue non-fonctionnel. Le projet vise à répondre à trois questions clés : Quels sont les effets du locus *NAM-B1* sur le rendement et la teneur en protéines des grains dans des lignées de blé d'hiver ? Quel est son impact sur l'initiation de la sénescence et la remobilisation de l'azote des feuilles vers le grain ? Peut-on identifier des marqueurs moléculaires associés à la sénescence et à la remobilisation de l'azote pour une sélection plus efficace des variétés de blé ?

2 Matériel et méthode

► 2.1 Matériel végétal

L'allèle fonctionnel du gène *NAM-B1* a été transféré par rétrocroisement dans deux fonds génétiques : la variété Skerzoo (INRA, 2011) qui montre un écart positif à la relation négative entre le rendement et la concentration en protéines (GPD+) et la variété Arlequin (Nickerson, 2007) qui montre un écart négatif (GPD-). Les lignées donneuses de l'allèle fonctionnel *NAM-B1* proviennent de J. Dubcovsky (Davis, USA). Le tri des lignées s'est fait d'abord grâce au marqueur PCR (Xuhw89) situé à 0,1 cM du gène d'intérêt. Ce marqueur a été transformé ensuite en marqueur KASPAR dans le cadre du projet FSOV 2010H (coord. P. Sourdille). Sur la base des données de génotypage, la similitude entre lignées soeurs est supérieure à 96%.

► 2.2 Évaluation au champ

Réseau expérimental

Les deux couples de lignées isogéniques ont été expérimentés pendant deux ans sur trois sites : INRAE Clermont-Ferrand (63) (2019, 2020), Limagrain Verneuil-l'Étang (77) (2019, 2020), Arvalis Ouzouer-le-Marché (41) (2019) et Arvalis Saint-Bonnet-de-Mure (69) (2020). A Clermont-Ferrand et Verneuil-l'Étang, trois traitements azotés ont été appliqués : dose bilan (X), dose sub-optimale concentrée sur les premiers apports (X-60 kg N/ha) et dose sub-optimale concentrée sur les apports tardifs (X-60 kg N/ha). A Ouzouer-le-Marché et Saint-Bonnet-de-Mure une combinaison de traitements azoté et hydrique a été appliquée : dose bilan (X) et dose sub-optimale apport précoce (X-80 kg N/ha) irriguées, et dose sub-optimale

apport précoce (X-80 kg N/ha) pluviale. Au total, les deux couples de lignées ont donc été testés dans 18 environnements. Trois blocs de répétitions ont été implantés dans tous les environnements sauf à Saint-Bonnet-de-Mure où il y avait quatre blocs.

Phénotypage

Pour chaque combinaison de l'environnement, la variété et la répétition, deux micro-parcelles adjacentes ont été semées. La première parcelle a été utilisée pour des prélèvements destructifs à la floraison et à la maturité. Ils ont permis de mesurer la matière sèche aérienne et la concentration en azote (méthode Dumas). La quantité d'azote absorbée avant la floraison et remobilisée vers le grain est estimée en soustrayant la quantité d'azote des parties végétatives à maturité à la quantité d'azote à floraison. L'efficacité de remobilisation est estimée en divisant la quantité d'azote mobilisée par la quantité d'azote absorbée à floraison dans les parties aériennes. La deuxième parcelle a été utilisée pour (i) des mesures d'indice de végétation (*Normalized Difference Vegetation Index*, NDVI) par GreenSeeker (Clermont-Ferrand), drone (Verneuil-l'Étang et Saint-Bonnet-de-Mure) et portique (Ouzouer-le-Marché), (ii) des observations de la date d'épiaison, (iii) des estimations des composantes du rendement, nombre d'épis par m² et poids de mille grains (PMG), (iv) de la hauteur des plantes, et (v) du rendement machine et de la concentration en protéines (spectrométrie dans le proche infra-rouge, NIRS).

Apport de la modélisation

Le modèle Sirius a été mis en œuvre en utilisant l'ensemble des données provenant des essais sur le terrain. Les premières prédictions générées par le modèle ont été employées afin d'évaluer l'homogénéité de l'ensemble de données et d'identifier diverses erreurs ou incohérences dans les variables, résultant de variations dans les notations ou de disparités dans les unités de mesure choisies par les différents partenaires. Des itérations successives entre l'ensemble de données et les prédictions du modèle Sirius ont permis de parvenir à un ensemble de données stables, cohérentes, et sous un format FAIR.

Statistiques

L'évolution du NDVI a été suivie en fonction des sommes de degrés.jour (°j base 0°C) depuis l'épiaison. Une courbe a été ajustée pour chaque micro-parcelle avec la fonction `smooth.spline()` du logiciel R. Cet ajustement a été utilisé pour déterminer la somme de degrés.jour après épiaison à laquelle le NDVI avait baissé de la moitié de sa valeur maximale.

Pour toutes les variables disponibles, le modèle d'analyse de variance à effets fixes suivant a été utilisé :

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + F_j + E_k + AF_{ij} + AE_{ik} + FE_{jk} + AFE_{ijk} + EB_{kl} + e_{ijkl}$$

où Y_{ijkl} représente la variable Y mesurée pour l'allèle A_i (fonctionnel ou non fonctionnel), pour le fond génétique F_j (Skerzoo ou Arlequin), l'environnement E_k (de 1 à 18) et le bloc de répétition B_l (de 1 à 3 ou 1 à 4), suivi de la moyenne générale μ , des effets principaux, des effets d'interaction, de l'effet bloc hiérarchisé à l'environnement et de la résiduelle.



► 2.3 Évaluation en conditions semi-contrôlées en serre

Condition de culture

Les couples de lignées isogéniques (Arlequin et Skerzso) ont été cultivés sous serres climatisées successivement en 2019 et 2020, dans des pots remplis d'un mélange de sable et de terreau. A chaque culture, 144 plantes ont été arrosées 4 fois par jour par un système de goutte à goutte avec une solution nutritive non limitante en azote (5,0 mM KNO₃). A la floraison, une moitié des plantes est restée à 5,0 mM et l'autre est passée à une solution faible (0,5 mM KNO₃). La nutrition différentielle a été conduite jusqu'à la maturité des grains.

Marquage des plantes au ¹⁵N

Une semaine avant la montaison, 60 ml d'une solution d'enrichissement de 5,0 et 0,5 mM de K¹⁵NO₃ 10% ont été appliqués au pied de chaque plante. A la fin de leur cycle, lorsque toutes les graines étaient mures et que les plantes étaient sèches, les plantes ont été récoltées en deux parties : premiers épis et restes. Les échantillons ont été ensuite séparés en (i) feuilles 1 à 4, (ii) tiges, (iii) rachis, et (iv) grains. Pour chaque organe, des sous-échantillons de 1 000-2 000 µg ont été soigneusement pesés dans des capsules d'étain afin de déterminer les pourcentages totaux de C et de N (N% et C% en mg (100 mg DW)⁻¹) et l'abondance de ¹⁵N à l'aide d'un analyseur élémentaire organique FLASH 2000 (Thermo Fisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific).

Le flux d'azote remobilisé correspond à l'azote recyclé des vieux organes, tels que les feuilles sénescentes, transporté vers les graines. L'indice ¹⁵NHI mesure la remobilisation de l'azote et correspond à la proportion de l'azote remobilisé alloué aux graines (Marmagne *et al.* 2020). Le rapport entre ¹⁵NHI et HI définit l'efficacité de la remobilisation de l'azote (NRE). La NRE compare la proportion de la remobilisation de l'azote qui va aux graines à la proportion de biomasse produite par les graines par rapport à l'ensemble de la plante.

Phénotypage (cinétique)

La teneur en chlorophylle des 4 dernières feuilles a été suivie par une pince Dualex (Force A) trois fois par semaine à partir de la montaison. Les données journalières ont été transformées en degrés jours à partir de la date de floraison.

A partir de la floraison, trois plantes par condition et génotype ont été prélevées toutes les semaines pour constituer une cinétique de prélèvement, couvrant les différents stades de développement (T1 à T6).

Analyses protéomiques

Les données protéomiques ont été acquises par spectrométrie de masse de type label-free à partir des protéines solubles extraites des feuilles et des grains prélevés aux 6 stades de développement de la variété Skerzso cultivée en conditions contrôlées. L'identification des peptides et l'inférence des protéines ont été réalisées avec X!TandemPipeline (Langella *et al.*, 2017) et la quantification des protéines avec MassChroQ (Valot *et al.*, 2011). Les identifications ont été faites sur la base *uniprot taxonomie* « 4564 » triticum (423 604 entrées).

Sur chaque jeu de données, de manière indépendante, les abondances des protéines ont été centrées et réduites par échantillon. Elles ont ensuite été analysées sous R avec un modèle d'analyse de variance comprenant les facteurs allèle, temps (date de prélèvement), nutrition, et toutes les interactions d'ordre 2 et d'ordre 3. Enfin, les abondances centrées réduites ont été divisées par la valeur maximale observée pour chaque protéine. A partir de cette normalisation, les protéines présentant des profils d'expression similaires au cours du temps ont été regroupées en clusters à l'aide d'un partitionnement hiérarchique (méthode ward D2), réalisé avec la fonction *pHeatmap* de R. Pour chaque cluster, une analyse d'enrichissement des annotations GO a été réalisée à l'aide *ShyngiGO* (Ge *et al.*, 2020).

Méta-Analyse

Les gènes codant pour les protéines dont l'abondance est impactée significativement par le génotype ont été identifiés et localisés sur la séquence de référence du blé (refseq CS v2.1) par *tblastn*. Ce travail a permis de récupérer les numéros d'accèsion et les coordonnées de ces gènes à partir desquelles, les polymorphismes de séquence présents dans un intervalle de 1500 nucléotides en amont et en aval de chacun d'entre eux ont été listés. Les données de génotypage pour ces marqueurs ont été extraites d'une matrice de 261 000 marqueurs publics obtenue avec la puce BreedWheat Axiom TaBW410k (Rimbert *et al.*, 2018) pour les 196 lignées d'une collection phénotypée pour la concentration en protéine (GPC) et le GPD dans un réseau d'essai (3 lieux, 2 années de culture, 2 modalités de culture (faibles ou forts intrants) décrit dans Bordes *et al.* (2013). La matrice de génotypage des marqueurs moléculaires présents dans les gènes codant les protéines différenciellement abondante (DAP) et la matrice de phénotypage ont été utilisées pour une approche de génétique d'association réalisée avec la fonction GWAS du package *rrBLUP* version 4.6.2 (Endelman, 2011). Les matrices d'apparement ont été calculées à partir des 261 000 marqueurs par la méthode *Leave One Chromosome Out* (Rincet *et al.*, 2014). Un test du FDR (False Discovery rate) a été réalisé. Le seuil de 10% a été retenu pour déclarer un marqueur significativement associé à un des caractères étudiés.

3 Résultats

► 3.1 Quels sont les effets du locus *NAM-B1* sur le rendement et la teneur en protéines des grains dans les lignées de blé d'hiver ?

Les résultats de l'analyse de variance montrent un effet significatif de l'allèle sur la concentration en protéines du grain, sans effet sur le rendement (Tableau 1).

En moyenne, l'allèle fonctionnel augmente la concentration en protéines du grain de 0,5 point. L'interaction avec l'environnement (année x site x traitement) n'est pas significative malgré la diversité de scénarios hydriques et azotés. Les différents traitements générés, principalement des niveaux et stades d'application de l'azote, n'ont donc pas fortement modifié l'impact de l'allèle fonctionnel. L'effet de l'allèle ne dépend pas non plus du fond génétique, le résultat étant semblable pour Arlequin et Skerzso (Figure 1) malgré des teneurs

Variable	Effet Allèle	Effet Allèle x Environnement	Moyenne allèle fonctionnel	Moyenne allèle non fonctionnel
Date épiaison (j)	ns	<0,001	130,1	130,1
Rendement (q/ha à 0% humidité)	ns	ns	65,0	65,3
Concentration protéines (%)	<0,001	ns	12,8	12,3
Rendement en protéines (q/ha)	<0,001	ns	8,2	7,9
Indice de récolte	ns	ns	0,462	0,463
Indice de récolte de l'azote	<0,001	ns	0,781	0,758
Hauteur (cm)	ns	ns	85	85
PMG (g à 0% humidité)	<0,001	ns	34,2	35,1
Nombre d'épis / m ²	<0,001	ns	504	469
Nombre de grains (/m ²)	<0,001	ns	19008	18100
N floraison (kg N /ha)	ns	0,015	136,5	138,4
N post-floraison (kg N /ha)	ns	ns	46,2	51,6
Efficacité de remobilisation (%)	<0,001	ns	68	63
50% NDVImax (°j) depuis épiaison)	<0,001	0,036	662	699

Tableau 1 : Résultats de l'analyse de variance globale sur les 18 environnements et moyenne des deux allèles de *NAM-B1*.

en protéines moyennes assez différentes (11,9 vs 13,3%) en lien en partie avec le potentiel de rendement de ces deux variétés (66,1 vs 64,2 q/ha à 0% humidité) et le fait que Skerzso soit classée comme variété GPD+. L'effet de l'allèle sur la concentration en protéines sans impact sur le rendement se traduit par une augmentation de 0,3 q/ha du rendement en protéines (Tableau 1). De même l'indice de récolte de l'azote est légèrement plus fort.

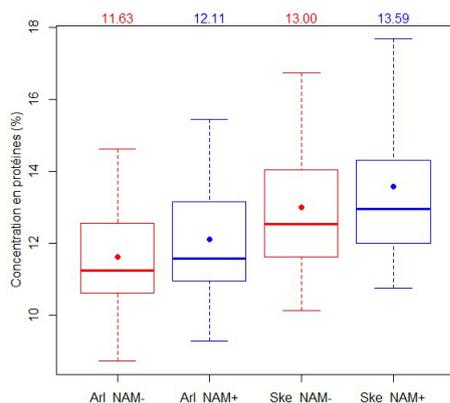


Figure 1 : Concentration en protéines (%) mesurées sur les 18 environnements pour les deux fonds génétiques (Arl, Arlequin ; Ske, Skerzso) et les deux allèles de *NAM-B1* (*NAM-*, allèle non fonctionnel ; *NAM+*, allèle fonctionnel). Les points représentent les moyennes, reportées au-dessus de chaque boxplot.

La date d'épiaison et la hauteur des plantes ne sont en moyenne pas influencées par l'allèle. Par contre, le nombre d'épis / m² et le nombre de grains / m² sont plus élevés et le PMG légèrement plus faible pour les lignées possédant l'allèle fonctionnel (34,2 vs 35,1 g).

► 3.2 Quel est l'impact du locus *NAM-B1* sur l'initiation de la sénescence et la remobilisation de l'azote des feuilles vers le grain ?

NAM-B1 active la sénescence des feuilles

Dans des conditions de culture contrôlées, la concentration en chlorophylle des feuilles décroît en fonction de leur position sur la plante et de leur âge (Figure 2). Les feuilles portant l'allèle fonctionnel présentent une diminution plus prononcée de la teneur en chlorophylle (Figure 2), et une augmentation en parallèle des anthocyanes et des flavonoïdes (données

non présentées), marquant un processus de vieillissement foliaire accéléré d'environ 10-11 jours par rapport aux feuilles des plantes portant l'allèle non fonctionnel. Ces observations confirment l'impact de *NAM-B1* sur le vieillissement des feuilles chez les variétés de blé européennes étudiées. La différence de concentration en chlorophylle entre les deux lignées est notable sur la feuille étendard (feuille 1) à partir de la floraison, mais elle se manifeste également avant la période de floraison sur les premières feuilles formées (feuilles 2 à 4), ce qui suggère que l'effet de *NAM-B1* influence à la fois le processus de sénescence séquentiel et monocarpique. En outre, les variations dans la composition en N des solutions nutritives appliquées après la floraison n'altèrent pas les tendances observées, ce qui suggère que les différences de nutrition n'ont pas d'incidence sur l'impact du locus *NAM-B1* sur la sénescence.

L'activité de *NAM-B1* sur la sénescence est confirmée en plein champ. En effet, l'allèle fonctionnel de *NAM-B1* a un effet significatif sur la sénescence du couvert et sur la remobilisation de l'azote vers le grain (Tableau 1). La date

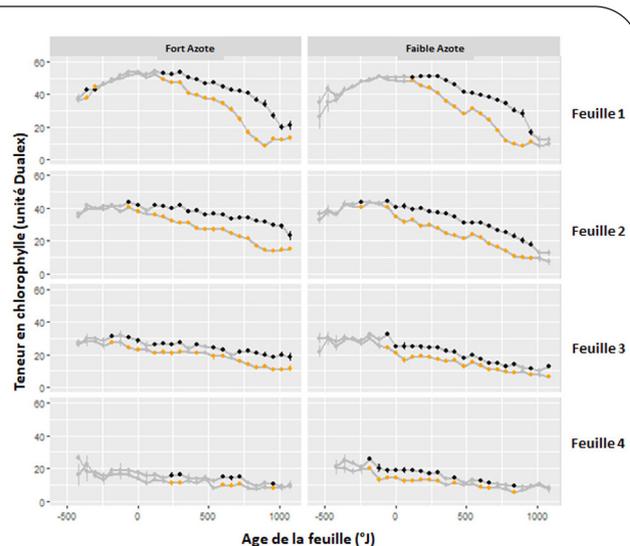


Figure 2 : Évolution de la teneur en chlorophylle des 4 premières feuilles à partir de l'épis chez le couple Skerzso cultivé à fort ou faible niveau d'azote. Les points oranges et noirs indiquent une différence significative de teneur ($P < 0,001$), respectivement entre l'allèle fonctionnel et l'allèle non fonctionnel, alors que les points gris marquent des différences non significatives entre les allèles.

de sénescence après épiaison, estimée par la somme de degrés.jour à laquelle le NDVI est divisé par deux par rapport à sa valeur maximale, est accélérée d'environ 44 °j, soit 2-3 jours en fonction des températures moyennes observées à la fin du remplissage du grain. Les différences d'effet observées entre les conditions de champ et en condition contrôlée peuvent s'expliquer par des différences de mesures (NDVI versus Dualex).

NAM-B1 favorise la remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains

En condition contrôlée, les plantes portant l'allèle fonctionnel sont un peu plus petites que les plantes portant l'allèle non fonctionnel, en particulier pour les épis secondaires. Toutefois, l'allèle fonctionnel favorise l'allocation de l'azote dans les grains dans les premiers épis, sans pour autant modifier le rendement. En marquant l'azote stocké au stade végétatif avec un isotope lourd (¹⁵N), nous avons montré que l'allèle fonctionnel favorise la remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains. La part de l'azote remobilisé des feuilles qui va dans le grain augmente de 10% sous une faible disponibilité en azote et de 11% sous une forte disponibilité post-floraison.

Au champ, l'efficacité de la remobilisation vers le grain de l'azote absorbée avant la floraison est améliorée par l'allèle fonctionnel de 5 points (Tableau 1). Cela se traduit par un surplus d'environ 7 kg N/ha remobilisés, qui expliquent le rendement en protéines supérieur. En

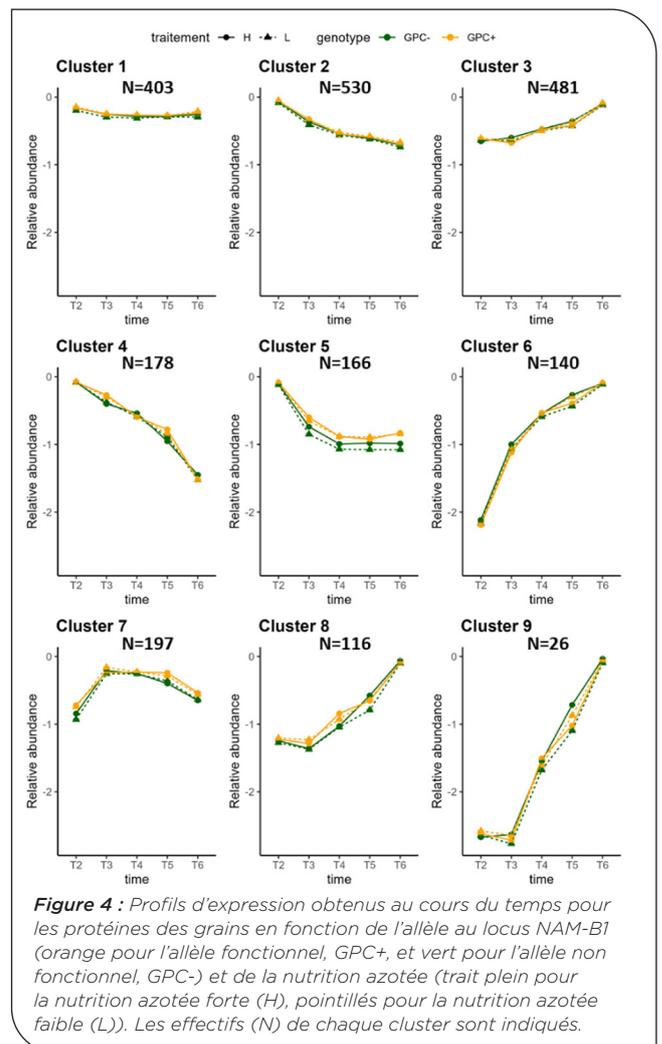
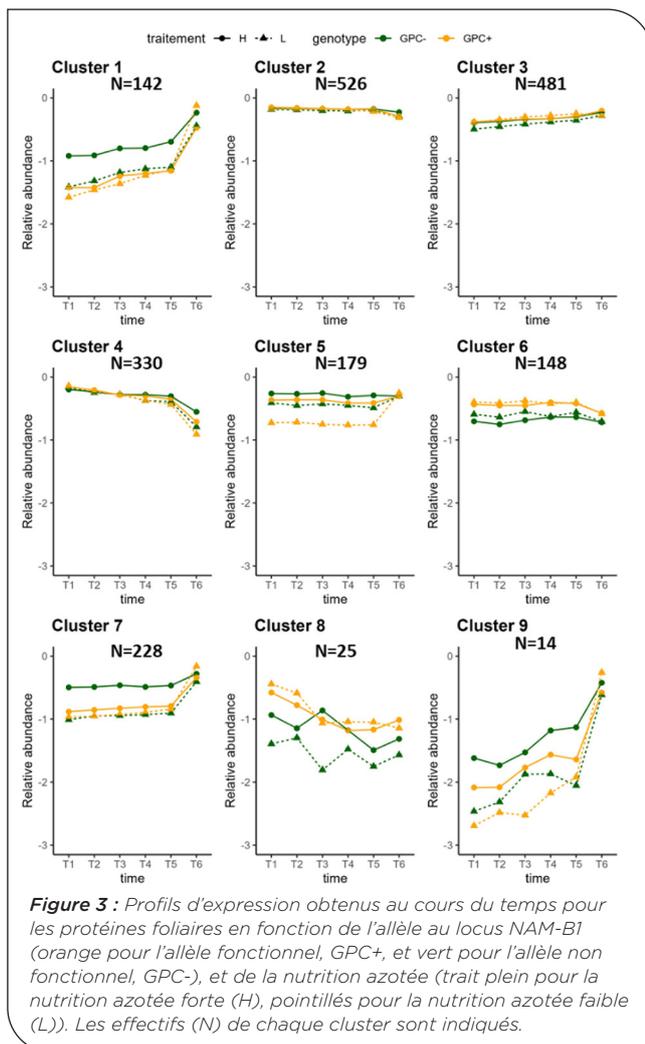
effet, ni la quantité d'azote absorbée à la floraison, ni la quantité d'azote absorbée en post-floraison ne sont significativement différentes entre les deux allèles.

► 3.3 Peut-on identifier des marqueurs moléculaires associés à la sénescence et à la remobilisation de l'azote pour une sélection plus efficace des variétés de blé ?

NAM-B1 modifie les profils d'accumulation de protéines dans les feuilles et les grains

Pendant le processus de remplissage des grains, une étude de protéomique a été menée pour analyser la cinétique des prélèvements de feuilles et de grains. Cette analyse a permis de quantifier 2084 protéines dans les extraits protéiques des feuilles et 2052 dans ceux des grains, avec un chevauchement de 654 protéines communes. À partir de ces données, deux approches ont été développées pour identifier les protéines modulées en présence de NAM-B1 : une analyse par clustering hiérarchique des profils cinétiques des protéines, une ANOVA portant sur les quantités de protéines à différents moments.

La clusterisation des données d'abondance normalisées révèle l'existence de 9 profils d'accumulation à la fois pour les feuilles et les grains (Figures 3 et 4). Les plus gros clusters des protéines foliaires montrent une cinétique décroissante de la photosynthèse et de la traduction (clusters 2 et 3) et une cinétique croissante des protéines impliquées dans la respiration anaérobie (cluster 4),



en cohérence avec la sénescence croissante observée avec l'âge des feuilles (Figure 2). Les autres clusters des protéines foliaires montrent principalement des différences entre les allèles (Figure 3). Ainsi, les 148 protéines du cluster 6, dont les fonctions sont liées aux enzymes du métabolisme des acides aminés, avec par exemple une glutamine synthétase cytosolique (Q6RUJ1), présentent des quantités plus importantes lorsque l'allèle *NAM-B1* est fonctionnel. Le clustering des profils des protéines des grains montrent des protéines qui s'accumulent (clusters 3, 6, 8, 9), qui décroissent (clusters 1, 2, 5), ou s'accumulent transitoirement (cluster 7) (Figure 4). Seuls les clusters 1, 5, 7 et 8 mettent en évidence des variations entre les profils liés aux allèles ou à la nutrition.

L'ANOVA met en évidence un fort effet significatif ($p < 0.01$) de l'âge des organes pour 1947 protéines des grains et 1253 des feuilles (Tableau 2). Un effet allèle significatif est observé pour 288 protéines foliaires et 562 protéines du grain, tandis qu'un effet de la nutrition est significatif pour 54 protéines foliaires et pour 158 protéines du grain. Des interactions entre facteurs sont également notées en particulier pour les protéines du grain (Tableau 2).

Facteur(s)	DAP Feuilles	DAP Grains
Âge de l'organe	1253	1947
Nutrition	54	158
Allèle	288	562
Âge de l'organe x nutrition	159	0
Âge de l'organe x Allèle	4	61
Nutrition x Allèle	0	74
Âge de l'organe x nutrition x Allèle	4	0

Tableau 2 : Résultats de l'ANOVA réalisée sur les données quantitatives ; DAP : protéine dont l'abondance varie. Leur nombre est indiqué par facteur considéré (âge de l'organe, nutrition, génotype) et de leur interaction.

Plusieurs protéines ayant des fonctions similaires présentent un effet significatif de l'allèle dans les feuilles et les grains. Ainsi, plusieurs protéines contenant un domaine phycocyanine. Ces protéines appartiennent aux clusters 1 (5 protéines) et 7 (2 protéines) du clustering des protéines foliaires. Dans ces clusters, leur abondance est la plus élevée dans les plantes sans l'allèle fonctionnel (GPC-) et sous un fort impact de la nutrition (Figure 3). De même, des protéines homologues à la *Nitrogen regulatory protein P-II* sont présentes dans le cluster 3 (*A0A3B5ZP11*) des extraits foliaires (Figure 3) et le cluster 1 (*A0A3B5XWE4*) des extraits grains (Figure 4). Leurs profils d'abondance (Figure 5) montrent un effet allèle marqué en nutrition faible azote chez les feuilles et en nutrition fort azote chez les grains.

Parmi les protéines dont l'abondance varie significativement uniquement dans les extraits foliaires et en relation avec la présence de l'allèle *NAM-B1*, on trouve celles dont les fonctions sont associées aux activités enzymatiques liées à la photosynthèse et à des activités de type protéases.

Les protéines spécifiques des grains différenciellement abondantes en fonction des allèles présentent des fonctions de type chaperonne/repliement (*folding*, *heat shock proteins*, *protein disulfide isomerase*,

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, *prefolding*), protéolytique (*aminopeptidases*) ou relevant du métabolisme des carbohydrates, du métabolisme du glutathion (*glutathione transferase*), et de la réponse au stress oxydatif (*peroxiredoxin*, *thioredoxin*).

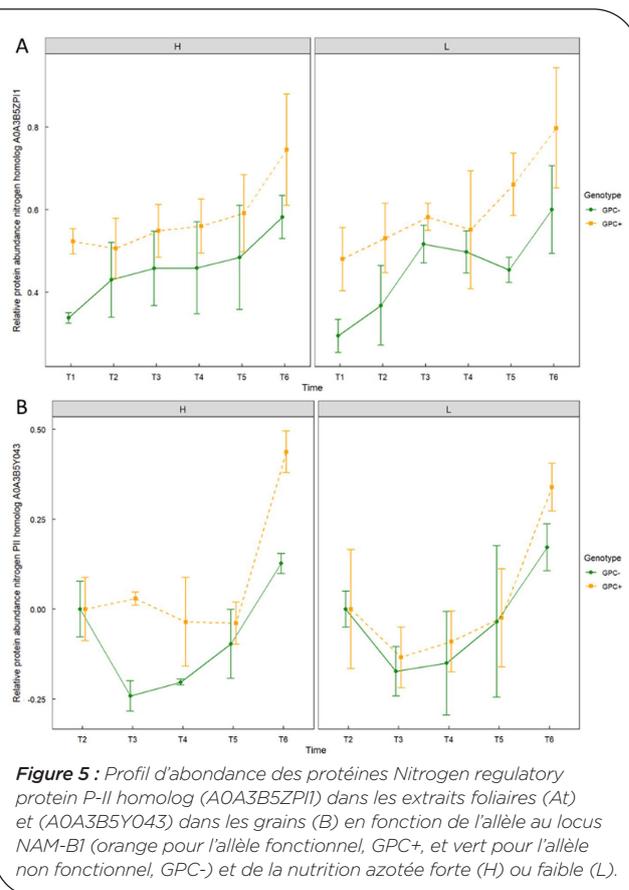


Figure 5 : Profil d'abondance des protéines *Nitrogen regulatory protein P-II* homolog (*A0A3B5ZP11*) dans les extraits foliaires (*At*) et (*A0A3B5Y043*) dans les grains (B) en fonction de l'allèle au locus *NAM-B1* (orange pour l'allèle fonctionnel, GPC+, et vert pour l'allèle non fonctionnel, GPC-) et de la nutrition azotée forte (H) ou faible (L).

Les protéines dont les profils d'accumulation dans les feuilles et les grains sont modifiés par *NAM-B1* constituent de nouveaux marqueurs de la remobilisation.

Les protéines dont l'accumulation varie en fonction de *NAM-B1* peuvent participer à la sénescence et à la remobilisation. Les polymorphismes de séquences localisés dans ou à proximité des gènes codant ces protéines ont été recherchés puis utilisés en génétique d'association avec le GPC moyen ou le GPD moyen, mesurés dans une collection de blé cultivée à faible ou fort intrant (6 environnements par condition), notés respectivement GPC_LN (GPD_LN) et GPC_HN (GPD_HN). Bien que les résultats soient encore en cours d'analyse, nous avons déjà identifié des associations significatives.

Le gène *Traes7B02G349100* du chromosome 7B présente plusieurs marqueurs en déséquilibre de liaison avec les deux caractères étudiés, quelle que soit la nutrition azotée. Ce gène code pour un cytochrome P450 (*A0A3B6RV1*) présent dans le cluster 2 des extraits foliaires (Figure 3). Le profil d'abondance de cette protéine montre un fort effet allèle pour les premiers stades de développement en particulier pour la nutrition fort azote (Figure 6).

Le gène *TraesCS4A02G099800* du chromosome 4A ressort également avec plusieurs marqueurs associés

significativement aux GPC_LN et GPC_HN. Il code pour une ATP synthase de la sous-unité b', chloroplastique (AOA3B6HQK1) présente dans le cluster 4 des protéines des extraits foliaires (Figure 3).

Les résultats de l'analyse d'association révèlent des gènes étroitement liés au GPD et au GPC, dans un contexte où aucune des lignées étudiées ne porte l'allèle fonctionnel de *NAM-B1*. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle ces gènes interviendraient dans le processus de remobilisation, avec une ampleur qui serait modulée par les différents allèles de *NAM-B1*.

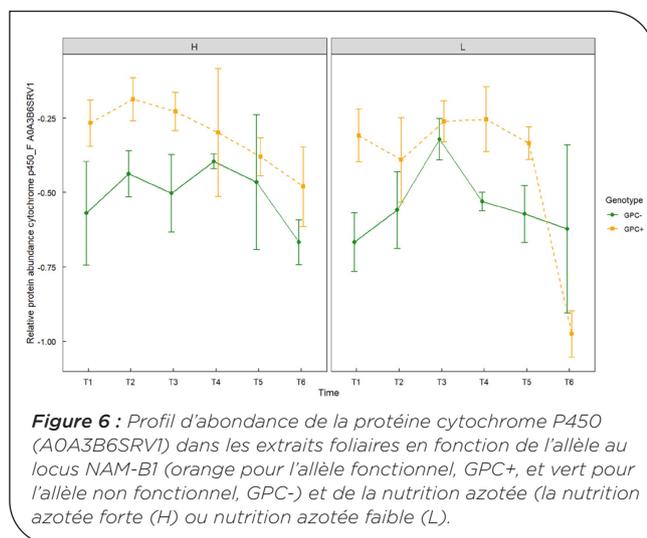


Figure 6 : Profil d'abondance de la protéine cytochrome P450 (AOA3B6SRV1) dans les extraits foliaires en fonction de l'allèle au locus *NAM-B1* (orange pour l'allèle fonctionnel, GPC+, et vert pour l'allèle non fonctionnel, GPC-) et de la nutrition azotée (la nutrition azotée forte (H) ou nutrition azotée faible (L)).

4 Discussion

NAM-B1 a été identifié comme un locus favorisant l'augmentation de la teneur en protéines du grain (GPC) chez le blé tétraploïde et hexaploïde (Brevis et Dubcovsky, 2010). Nos résultats ont révélé qu'après l'introduction du gène *NAM-B1* dans un fond génétique européen, le GPC a été significativement augmenté dans trois sites d'essais avec des traitements différents, sans affecter le rendement. Cette augmentation de la teneur en protéines variait de 11,9% à 13,3%. Ces observations sont en accord avec les résultats précédemment rapportés dans la littérature scientifique (Chee *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2013 ; Tabbita *et al.*, 2017).

Nous avons observé dans les deux fonds génétiques européens que l'introgession de l'allèle fonctionnel du gène *NAM-B1* induit une accélération de la sénescence des feuilles, aussi bien en conditions de culture contrôlée qu'en plein champ. Cette accélération est associée à une amélioration de l'efficacité de remobilisation des feuilles vers les grains, principalement sur les épis principaux en conditions contrôlées. Cela confirme des résultats précédents ou l'introduction dans des fonds génétiques américains, indiens et australiens a montré une accélération de la sénescence et de la maturation du grain (Chee *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2013), en cohérence avec les effets phénotypiques rapportés des gènes *NAM* sur

la remobilisation de l'azote (Uauy *et al.* 2006; Waters *et al.* 2009). Nous avons pu quantifier au champ dans deux fonds génétiques de type hiver l'impact de l'allèle fonctionnel sur la sénescence (accélération de 2-3 jours) en accord les observations déjà publiées dans des fonds génétiques de type printemps (Tabbita *et al.*, 2017). Nous avons aussi quantifié au champ, à notre connaissance pour la première fois, l'augmentation de l'efficacité de remobilisation de l'azote (+8%).

Les protéines identifiées dont l'abondance varie en fonction de l'allèle de *NAM-B1* conjointement avec la sénescence, la remobilisation et/ou le remplissage, peuvent être considérées comme des marqueurs moléculaires de ces processus. Certaines d'entre elles (aminotransférase, glutamine synthétase, thiorédoxine, glycosyltransférase, cytochrome P450, phycocyanine) ont déjà été associées à ces processus dans des méta-analyses publiées (Saini *et al.*, 2022, Gudi *et al.* 2022), tandis que d'autres sont potentiellement de nouvelles candidates nécessitant une validation et une caractérisation ultérieures, notamment une protéine homologue à la Nitrogen regulatory PII. Cette protéine pourrait être un acteur central de la détection et de la régulation du statut azoté et de l'équilibre C/N, ce qui a été confirmé par la découverte d'une liaison directe de la glutamine à ces protéines (Chellamuthu *et al.* 2014). Les PII seraient des senseurs de la glutamine et à ce titre un acteur important dans l'assimilation de l'azote.

Après la phase d'analyse génétique effectuée dans une collection où tous les génotypes portent l'allèle non fonctionnel de *NAM-B1* (Hagenblad *et al.*, 2012), certaines protéines se distinguent, notamment les protéines cytochrome P450. Ces associations suggèrent que ces protéines, liées à la sénescence et la remobilisation de l'azote, peuvent exercer leur fonction de manière indépendante vis-à-vis de ce facteur de transcription. Au niveau transcriptionnel, des facteurs de transcription ont été identifiés comme des régulateurs clés de la sénescence des feuilles chez les plantes (Kim *et al.*, 2016), en particulier chez le blé (Zhao *et al.*, 2020 ; Andleeb *et al.*, 2020). Ces facteurs agissent à travers des réseaux de régulation complexes intégrant de multiples voies de signalisation. Parmi eux, les gènes des familles NAC et WRKY ont été largement étudiés et il a été démontré qu'ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de la sénescence des feuilles (Zhang *et al.*, 2020). L'analyse protéomique réalisée ici ne permet pas de quantifier des facteurs de transcription faiblement représentés dans les extraits protéiques. Toutefois les plusieurs protéines différenciellement accumulées selon la présence de l'allèle fonctionnel ou non du gène *NAM-B1* semblent être régulés par des facteurs de la famille WRKY impliqués dans les processus de sénescence chez *Arabidopsis* ou de contenu du grain chez le riz.

L'ensemble des résultats obtenus dans le projet Remoblé ouvrent de nouvelles perspectives en matière de développement de marqueurs pour la sélection de variétés à haute teneur en protéines dans les programmes d'amélioration génétique.

Références bibliographiques

- Andleeb T., Knight E., Borrill P.** (2023) Wheat NAM genes regulate the majority of early monocarpic senescence transcriptional changes including nitrogen remobilization genes. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, Volume 13, Issue 2, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac275>
- Bordes J., Ravel C., Jaubertie J.P., et al.** (2013) Genomic regions associated with the nitrogen limitation response revealed in a global wheat core collection. *Theor Appl Genet.* 126(3):805-22. doi: 10.1007/s00122-012-2019-z.
- Brevis, J.C. and Dubcovsky, J.** (2010) Effects of the Chromosome Region Including the Gpc-B1 Locus on Wheat Grain and Protein Yield. *Crop Sci.*, 50: 93-104. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.02.0057>
- Cantu D., Pearce, S.P., Distelfeld A. et al.** (2011) Effect of the down-regulation of the high Grain Protein Content (GPC) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence. *BMC Genomics* 12, 492. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-492>
- Chen, Xu et al.** (2014) The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway." *Plant & cell physiology* vol. 55,3: 604-19. doi:10.1093/pcp/pct204
- Chellamuthu V-R, Ermilova E, Lapina T, et al.** (2014) A Widespread Glutamine-Sensing Mechanism in the Plant Kingdom. *Cell.* 159(5):1188-1199. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.015>
- Cormier, F. ; Troude, M. ; Ravel, C. ; Gouis, J.L. ; Leveugle, M.; Lafarge, S. ; Exbrayat, F. ; Duranton, N. ; Praud, S.** (2015) Detection of NAM-A1 Natural Variants in Bread Wheat Reveals Differences in Haplotype Distribution between a Worldwide Core Collection and European Elite Germplasm. *Agronomy*, 5, 143-151. <https://doi.org/10.3390/agronomy5020143>
- DePauw, R. M., Knox, R. E., Clarke, F. R., Wang, H., Fernandez, M. R., Clarke, J. M., et al.** (2007). Shifting undesirable correlations. *Euphytica* 157, 409-415. doi: 10.1007/s10681-007-9379-5
- Distelfeld, A., Uauy, C., Fahima, T. and Dubcovsky, J.** (2006) Physical map of the wheat high-grain protein content gene Gpc-B1 and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytologist*, 169: 753-763. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01627.x>
- Eagles H. A., McLean Robyn, Eastwood R. F., Appelbee M.-J., Cane Karen, Martin P. J., Wallwork H.** (2014) High-yielding lines of wheat carrying Gpc-B1 adapted to Mediterranean-type environments of the south and west of Australia. *Crop and Pasture Science* 65, 854-861. <https://doi.org/10.1071/CP14106>
- Endelman, J.B.** (2011). Ridge Regression and Other Kernels for Genomic Selection with R Package rrBLUP. *The Plant Genome* 4, 250-255. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2011.08.0024>.
- Ge, S. X., Jung D., Yao, R.** (2020) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 8, April 2020, Pages 2628-2629, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gudi, S., Saini, D.K., Singh, G. et al.** (2022) Unravelling consensus genomic regions associated with quality traits in wheat using meta-analysis of quantitative trait loci. *Planta* 255, 115. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03904-4>
- Guo, Y. and Gan, S.** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46: 601-612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02723.x>
- Hagenblad J., Asplund L., Balfourier F., et al.** (2012) Strong presence of the high grain protein content allele of NAM-B1 in Fennoscandian wheat. *Theor Appl Genet.*125):1677-86. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1943-2>.
- Kim HJ, Nam HG, Lim PO.** (2016) Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol.* 2016;33:48-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.002>
- Kumar J, V Jaiswal, A Kumar, N Kumar, RR Mir, S Kumar, R Dhariwal, S Tyagi, M Khandelwal, K V Prabhu, R Prasad, HS Balyan, PK Gupta.** (2011) Introgression of a major gene for high grain protein content in some Indian bread wheat cultivars. *F Crop Res.* 2011;123(3):226-233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.013>
- Langella O, B Valot, T Balliau, M Blein-Nicolas, L Bonhomme, M Zivy.** (2017) X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J Proteome Res.* 2017;16(2):494-503. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00632
- Liang, Chengzhen et al.** (2014) OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *PNAS* vol. 111,27: 10013-8. doi:10.1073/pnas.1321568111
- Marmagne A, C Masclaux-Daubresse, F Chardon.** (2022) Modulation of plant nitrogen remobilization and postflowering nitrogen uptake under environmental stresses. *J Plant Physiol.* 153781. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153781>
- Monaghan, J.M., Snape, J.W., Chojecki, A.J.S. et al.** (2001) The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* 122, 309-317 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1012961703208>
- Oury, FX., Godin, C.** (2007) Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* 157, 45-57. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9395-5>
- Plessis A., Ravel C., Duchateau N., et al.** (2013) Genetic Mapping of Wheat Grain Protein Composition Reveals that Gliadin and Glutenin Composition are Trans-Regulated by Different Chromosomal Regions. *Journal of Experimental Botany* 64 : 3627-3644. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert188>.
- Rimbert H., Darrier B., Navarro J., et al.** (2018) High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLOS ONE* 13:e0186329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186329>.
- Rincent R., Moreau L., Monod H. et al.** (2014). Recovering Power in Association Mapping Panels with Variable Levels of Linkage Disequilibrium. *Genetics* 197, 375-387. 10.1534/genetics.113.159731.
- Saini P, I Sheikh, DK Saini, RR Mir, HS Dhaliwal, V Tyagi.** (2022) Consensus genomic regions associated with grain protein content in hexaploid and tetraploid wheat. *Front Genet.*;13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1021180>.

Tabbitta, F., Lewis, S., Vouilloz, J.P., Ortega, M.A., Kade, M., Abbate, P.E. and Barneix, A.J. (2013), Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breed*, 132: 48-52. <https://doi.org/10.1111/pbr.12011>

Tabbitta F, Pearce S, Barneix AJ (2017) Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: Ten years of the GPC-B1 gene. *J Cer Sci* 73:183-191 [10.1016/j.jcs.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.003)

Uauy, Cristobal et al. (2006a) A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science (New York, N.Y.)* vol. 314,5803: 1298-301. [doi:10.1126/science.1133649](https://doi.org/10.1126/science.1133649)

Uauy, C., Brevis, J.C., Dubcovsky, J. (2006b) The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat, *Journal of Experimental Botany*, <https://doi.org/10.1093/jxb/erl047>

Valot, B., Langella, O., Nano, E. and Zivy, M. (2011), MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*, 11: 3572-3577. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100120>

Waters, BM, Uauy,C., Dubcovsky,J. Grusak, M. A. (2009) Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain, *Journal of Experimental Botany*, Volume 60, Issue 15, Pages 4263-4274, <https://doi.org/10.1093/jxb/erp257>

Zhao, L., Zhang, W., Song, Q., Xuan, Y., Li, K., Cheng, L., Qiao, H., Wang, G. and Zhou, C. (2020), A WRKY transcription factor, TaWRKY40-D, promotes leaf senescence associated with jasmonic acid and abscisic acid pathways in wheat. *Plant Biol J*, 22: 1072-1085. <https://doi.org/10.1111/plb.13155>

RémoBlé : améliorer la remobilisation de l'azote pour augmenter la concentration en protéines du blé

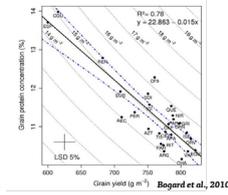
Fabien CHARDON¹, Emmanuelle BANCEL², Catherine RAVEL², Anne MARMAGNE¹, Manon LARDOS¹, Céline MASCLAUX-DAUBRESSE¹, Séverine ROUGEOL², Amélie BRESSON², Esther RODRIGUEZ DE HARO², Lilian FAURIE², David ALVAREZ², Sibille PERROCHON², Katia BEAUCHENE⁴, Aida ROUHI⁵, Valérie HERTEMAN⁶, Pierre MARTIN⁵, Pierrick VARENNE⁶, Jean-Charles DESWARTE³, Jacques LE GOUIS²

1 - Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (JIPB), Versailles
 2 - GDEC, INRAE, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand
 3 - ARVALIS, ZA des graviers, Route de Chateaufort, Villiers-le-Bâcle

4 - ARVALIS, Beauce-la-Romaine
 5 - LEPSE, Université Montpellier, INRAE, Institut Agro Montpellier, Montpellier
 6 - LIMAGRAIN EUROPE, Saint-Beauzire

CONTEXTE

- ✓ Teneur en protéines corrélée négativement avec le rendement
- ✓ Problématiques environnementales et économiques: réduction des intrants azotés



✓ **NAM-B1**, un facteur de transcription de la famille des NAC impliqué dans l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et de la teneur en protéines du grain codé par un gène sur le chromosome 6B

LE PROJET FSOV REMOBLÉ



OBJECTIF

Comprendre le fonctionnement du gène **NAM-B1** pour augmenter la concentration en protéines du grain de blé tendre

RESULTATS

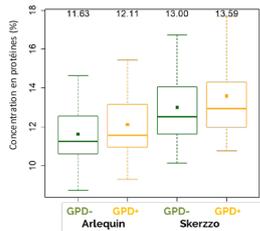
Utilisation de **lignées quasi-isogéniques** dans deux fonds génétiques contrastés, **Skerzto** et **Arlequin**.

Expérimentations aux champs

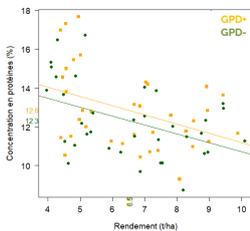


Les lignées quasi-isogéniques de Skerzto et Arlequin sont cultivées pendant deux ans dans un **réseau d'essais** combinant différents niveaux de **fertilisation azotée** et **disponibilité en eau**

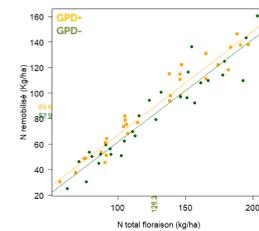
En moyenne, dans les deux fonds, l'allèle fonctionnel de **NAM-B1** augmente la concentration en protéines du grain de **+0.53 point**



Cette augmentation est **indépendante du rendement** en grains qui est très proche en moyenne entre les deux allèles



L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** entraîne une **meilleure efficacité de remobilisation de l'azote** (66% vs 60%) quelle que soit la quantité d'azote absorbée à la floraison



L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** accélère **significativement** (d'environ 44 °C), soit 2-3 jours **la sénescence du couvert**.

CONCLUSIONS

1. L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** augmente la concentration en protéines des grains indépendamment du fond génétique et du rendement au champ.
2. Il provoque une **sénescence foliaire précoce** et une **meilleure remobilisation de l'azote des feuilles vers le grain** au champ et en conditions contrôlées.
3. L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** modifie la cinétique d'abondance de plusieurs protéines dans les feuilles et les grains. Les gènes codant ces protéines peuvent servir de **marqueurs moléculaires pour suivre la sénescence et la remobilisation de l'azote** chez le blé tendre.

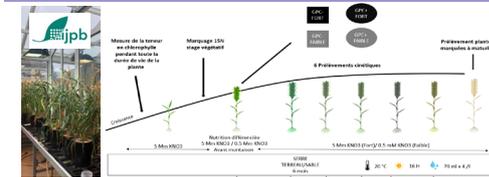
Références

Bogard M et al. (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
 Olmos S, Distelfeld A, Chicaiza O, Schlatter AR, Fahima T, Echenique V, Dubcovsky J (2003) Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. Theoretical and Applied Genetics 107:1243-1251

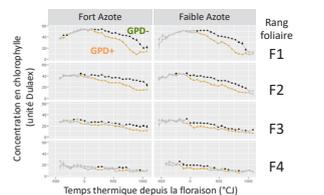
Remerciements: Plateforme Pappso, Marlène Davanture et Mélisande Blein-Nicolas.

GPD- = lignées avec l'allèle non fonctionnel de **NAM-B1** (formes parentales)
GPD+ = lignées avec l'allèle fonctionnel de **NAM-B1** (formes introgressées)

Expérimentations en conditions contrôlées



En serre, les lignées quasi-isogéniques, Skerzto et Arlequin **NAM-B1** sont cultivées avec une **forte** (5 mM KNO₃) ou **faible** (0,5 mM KNO₃) **disponibilité en azote** du sol après la montaison

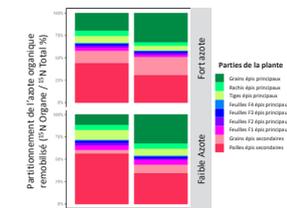


La **sénescence précoce** s'accompagne d'une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains

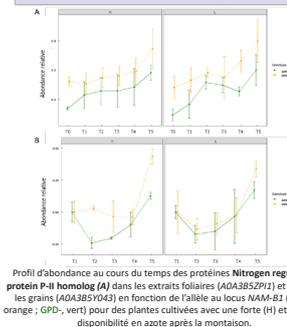
Facteur(s)	DAP Feuilles	DAP Grains
Âge de l'organe	1253	1947
Nutrition	54	158
Allèle	288	562
Âge de l'organe x nutrition	159	0
Âge de l'organe x Allèle	4	61
Nutrition x Allèle	0	74
Âge de l'organe x nutrition x Allèle	4	0

Les protéines dont les profils d'accumulation (DAP : protéines différenciellement accumulées) dans les feuilles et les grains sont modifiés par **NAM-B1** constituent de **nouveaux marqueurs potentiels de la remobilisation**.

NAM-B1 est responsable d'une **sénescence précoce** des feuilles proches de l'épi



NAM-B1 modifie les profils d'accumulation de protéines dans les feuilles et les grains



Profil d'abondance au cours du temps des protéines Nitrogen regulatory protein P-II homolog (A) dans les extraits foliaires (A0A3B52P1) et (B) dans les grains (A0A3B5Y043) en fonction de l'allèle au locus **NAM-B1** (**GPD+**, orange; **GPD-**, vert) pour des plantes cultivées avec une forte (H) et faible (L) disponibilité en azote après la montaison.

Logos des partenaires: République Française, INRAE, FSOV, ARVALIS Institut de végétal, Limagrain, GDEC (Genétique Diversité Eco-physiologie - Céréales), LEPSE (PLANT ADAPTATION TO CLIMATE CHANGE), jipb. Contact : fabien.chardon@inrae.fr

