

CRACQ (Clone the RAC875 QTL) : Clonage et caractérisation d'un gène de maintien du rendement en conditions de stress thermique et hydrique chez le blé

Mickaël THROUDE^{1*}, Delphine FLEURY², Penny TRICKER², Diane MATHER², Scott BODEN²,
Hervé DUBORJAL¹, Lauriane CHASSAING¹, Matthieu BOGARD³, Katia BEAUCHENE³

1 - Limagrain Europe - Centre de Recherche de Chappes 63720 Chappes, FRANCE

2 - School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide- PMBI Glen Osmond SA 5064, AUSTRALIA

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

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

1 Introduction

Notre projet répond à l'urgence de l'agriculture française et européenne face à la baisse des rendements céréaliers due aux évolutions climatiques. Alors que la demande mondiale en blé exige une augmentation annuelle de rendement de 1,6% (Lobell *et al.*, 2012), les taux stagnent à 1%. Les modèles climatiques prévoient une réduction de 4,1% à 6,4% des rendements pour chaque degré Celsius d'augmentation de la température moyenne planétaire (Liu *et al.*, 2016). En France, les pertes de rendement, estimées entre 1,5 et 2 quintaux par hectare (1,9% à 2%), augmentent avec chaque déficit hydrique de 10 mm (Gate, 1995), entraînant environ 740 000 tonnes de pertes nationales et un manque à gagner de plus de 100 millions d'euros. Notre projet vise à introduire de nouveaux allèles issus des variétés de blé australien, naturellement résistantes aux stress hydriques et thermiques, pour stabiliser les rendements des blés européens face au réchauffement climatique.

Malgré la connaissance de plusieurs gènes impliqués dans les réponses au stress hydrique et thermique chez les plantes, aucun gène de tolérance (assurant la stabilité du rendement en conditions de stress) n'a encore été identifié chez le blé. Les QTL (locus de caractères quantitatifs) associés au rendement dans des climats chauds et secs de type méditerranéen sont connus, mais leur utilisation dans les programmes de sélection est limitée. Deux obstacles majeurs se posent : d'une part, les performances des lignées d'introgessions de QTL sont variables en raison des interactions complexes avec l'environnement et le fond génétique ; d'autre part, la taille importante des intervalles des QTL entraîne souvent un autostop génétique négatif (entraînement de locus portants des allèles négatifs ou inadaptés), réduisant voire annulant leur effet positif. Pour surmonter ces difficultés, il est essentiel d'étudier systématiquement les QTL dans les environnements cibles, en prenant en compte les paramètres tels que le potentiel hydrique du sol et la température atmosphérique, ainsi que dans divers fonds génétiques. De plus, le clonage des gènes responsables des fonctions des QTL et les avancées récentes dans la génomique du blé (notamment l'assemblage du génome et les collections de mutants) permettent d'identifier et de caractériser de nouveaux gènes, contribuant ainsi à augmenter la diversité génétique nécessaire à la création variétale.

Ce projet s'est focalisé sur le QTL qDHY.3BL, responsable de la stabilité du rendement face aux variations climatiques. Ce QTL a été identifié dans une population

de blé de printemps issue du croisement des variétés australiennes RAC875 et Kukri. L'Université d'Adélaïde a mené une étude approfondie sur ce QTL localisé sur le chromosome 3B. Les résultats de 21 essais en champs en Australie et au Mexique ont montré que l'allèle de RAC875 améliore le rendement jusqu'à 12,5% par rapport à l'allèle de Kukri, ainsi que le poids des grains et la vigueur des plantes. L'interaction G x E a également été observée pour ce QTL. En fonction des conditions de sol, l'allèle RAC875 peut avoir un effet positif (sols profonds) ou nul (sols peu profonds en Australie méridionale), tandis que l'allèle de Kukri peut augmenter le rendement dans des conditions rares d'irrigation et de sols peu profonds. Une étude physiologique a montré que l'effet positif de l'allèle de RAC875 est associé à une augmentation de la biomasse, du poids et du nombre de grains lorsque la température dépasse 25°C au stade de floraison. De plus, ce QTL est présent chez la population australienne Drysdale/Gladius, où Drysdale porte l'allèle positif. Drysdale, adaptée aux sols profonds et aux climats chauds du Queensland et des Nouvelles Galles du Sud, pourrait être liée à la gestion de l'eau par la plante, une hypothèse qui a été testée dans le cadre de ce projet via l'utilisation de sondes « Sap Flow Meter » pour mesurer le flux de sève en conditions de stress.

L'analyse de ce QTL a été conduite via le développement d'une plateforme de phénotypage utilisant des containers en plastique pour simuler des sols profonds. Les expérimentations ont été réalisées dans un tunnel en polyuréthane pour élever la température ambiante pendant la phase de croissance des plantes. La cartographie fine du QTL a été réalisée sur une région de 690 kpb, contenant sept gènes, à l'aide de lignées recombinantes issues de la population biparentale RAC875 x Kukri. Ces travaux ont été initiés en amont dans le cadre de la thèse de doctorat de Pauline Thomelin et publiés durant ce projet (Thomelin *et al.* 2021). En utilisant les banques de séquençage du génome des quatre lignées parentales australiennes (Edwards *et al.* 2012), l'Université d'Adélaïde a identifié un gène présent dans l'intervalle de 690 kbp qui diffère entre Drysdale-RAC875 et Gladius-Kukri. Ce gène, modifié dans le promoteur chez RAC875, contient un domaine de réponse à l'acide abscissique, l'hormone de stress chez les plantes (Yoshida *et al.* 2014, *Curr Opin Plant Biol*). Des résultats préliminaires de PCR quantitative ont confirmé que ce gène serait sous-exprimé dans la lignée tolérante au stress RAC875. L'annotation du gène révèle de fortes homologies de séquence avec des gènes du



protéasome, un complexe protéique responsable de la dégradation de protéines spécifiques. Le protéasome est un complexe qui interagit avec l'ubiquitine et dégrade des protéines cibles. La voie ubiquitine-protéasome a un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que la croissance des plantes, la différenciation cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, les réponses aux stress et l'apoptose (Stone 2014, Front Plant Sci).

Notre hypothèse de travail était donc que ce gène candidat TraesCS3B02G572900 (chr3B:803628607 à 803630082), codait pour un régulateur négatif appartenant au complexe ubiquitine-protéasome (annoté IWGSCV1: E3 ubiquitin-protein ligase), que nous nommerons UBP. Ce gène étant sous-exprimé chez la lignée RAC875, le protéasome ne serait pas fonctionnel et par conséquent, la protéine cible ne serait pas dégradée, ce qui aurait un effet positif sur la biomasse et le développement des grains (Thomelin *et al.* 2021). Une mutation du gène candidat par TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) pourrait donc avoir un effet similaire à l'allèle de RAC875, augmentant la biomasse, le poids du grain et le rendement en condition de stress thermique et/ou hydrique.

Les travaux de ce projet ont été subdivisés en quatre volets complémentaires, visant à valider l'effet de l'allèle positif du gène TraesCS3B02G572900 et de faciliter l'utilisation du QTL qDHY.3BL en sélection, notamment dans les blés d'hiver utilisés en Europe. Le premier s'est focalisé sur l'étude de la variabilité allélique naturelle, au locus du QTL qDHY.3BL, dans des lignées de blé d'hiver et de printemps, par séquençage d'Exome. Le second a permis de développer du matériel végétal en vue de la validation fonctionnelle du gène candidat UBP via l'utilisation de la variabilité induite chimiquement présente dans des populations de mutants TILLING. Le troisième volet a consisté à caractériser phénotypiquement la variabilité naturelle du gène UBP et d'en décoder les mécanismes physiologiques dans un vaste réseau d'essai (France, US, Espagne, Australie, Mexique). Enfin, le dernier volet a permis de mettre en évidence le pattern d'expression de la protéine UBP par séquençage d'ARNm de lignées sous stress thermique et hydrique, cultivées en conditions contrôlées.

2 Matériel et méthode

► Caractérisation phénotypique de la variabilité induite et naturelle chez le blé d'hiver et de printemps en conditions naturelles et contrôlées

Matériel végétal

La validation de l'effet du QTL qDHY.3B sur le rendement en condition de stress hydrique et thermique a été réalisée par l'évaluation de lignées quasi-isogéniques (NIL) créées en amont du projet par Limagrain (fonds hiver) et l'Université d'Adélaïde (fonds printemps). 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 couvrant le QTL qDHY.3B. 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 3 fonds génétiques (de type printemps et hiver) décrits ci-dessous.

Lignées Isogéniques NIL HIF RAC875 x ALTIGO (fond hiver) : 3 couples

Trois couples de lignées quasi-isogéniques de type NIL HIF ont été produites à partir d'une population biparentale issue d'un croisement entre une variété de blé tendre d'hiver français nommée ALTIGO et la lignée printemps RAC875. Ces lignées ont été phénotypées en champ en condition de stress hydrique et thermique en 2017. Ces premiers essais avaient démontré des améliorations du rendement de +4.6% en condition stressée pour les lignées isogéniques porteuses de l'allèle RAC875, sur les essais les plus stressés.

CODE semis	Nom lignée	Couple NIL	Allele	Type
RAC-11	RAAL_Q3B_056.2_R	RAAL_Q3B_056.2	ALT	HIF
RAC-13	RAAL_Q3B_056.2_D	RAAL_Q3B_056.2	RAC	HIF
RAC-22	RAAL_Q3B_118.2_R	RAAL_Q3B_118.2	ALT	HIF
RAC-24	RAAL_Q3B_118.2_D	RAAL_Q3B_118.2	RAC	HIF
RAC-28	RAAL_Q3B_153.2_R	RAAL_Q3B_153.2	ALT	HIF
RAC-30	RAAL_Q3B_153.2_D	RAAL_Q3B_153.2	RAC	HIF
ALT	Altigo	control	ALT	line
RAC	RAC875	control	RAC	line

Tableau 1 : 3 couples de lignées isogéniques RAC875x ALTIGO

Lignées isogéniques NIL BC RAC875 x LG-ABSALON (fond hiver) : 5 couples

Les NIL BC (lignées quasi-isogéniques construites par backcross) sont des lignées quasiment identiques à la lignée receveuse, ce qui permet de mieux estimer l'effet du QTL dans un fond élite. Cette construction a l'avantage d'être plus facilement utilisable en sélection que le matériel de type NIL HIF qui peut contenir trop d'allèles exotiques pour initier des croisements. A partir des lignées HIF ALTIGO x RAC875, nous avons construit des lignées NIL BC par rétrocroisements successifs avec une variété de blé d'hiver français nommée LG-ABSALON (variété Limagrain française élite sud). Ce matériel a été construit au cours de ce projet et a pu être évalué en champ en année 3.

CODE semis	Nom lignée	Couple NIL	Allele	Type
LGPB20-0011	RAC-R18-03_1	RAC-R18-03	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0012	RAC-R18-03_3	RAC-R18-03	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0014	RAC-R18-07_2	RAC-R18-07	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0013	RAC-R18-07_0	RAC-R18-07	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0015	RAC-R18-08_0	RAC-R18-08	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0016	RAC-R18-08_4	RAC-R18-08	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0017	RAC-R18-09_0	RAC-R18-09	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0018	RAC-R18-09_4	RAC-R18-09	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0019	RAC-R18-19_0	RAC-R18-19	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0020	RAC-R18-19_4	RAC-R18-19	RAC	BCby Absalon
ABSALON	LG-ABSALON	control	Absalon	line
RAC	RAC875	control	RAC	line

Tableau 2 : 5 couples de lignées isogéniques RAC875x LG-ABSALON



Lignées Isogéniques NIL HIF RAC875 x KUKRI (fond printemps) : 4 couples

Quatre couples de lignées quasi-isogéniques de type NIL HIF ont été développées par l'Université d'Adélaïde à partir d'une population biparentale issue de deux lignées de printemps : RAC875 x KUKRI. Ces lignées ont été multipliées en début de projet en Australie pour permettre la mise en place des essais de phénotypage du volet 3 (en Espagne, Mexique et Australie).

CODE semis	Nom lignée	Couple NIL	Allele	Type
NIL 1	1056 A	1056	RAC	HIF
NIL 2	1056 B	1056	Kukri	HIF
NIL 3	2164 A	2164	RAC	HIF
NIL 4	2164 B	2164	Kukri	HIF
NIL 5	97 A	97	RAC	HIF
NIL 6	97 B	97	Kukri	HIF
NIL 7	1314 A	1314	RAC	HIF
NIL 8	1314 B	1314	Kukri	HIF

Tableau 3 : 4 couples de lignées isogéniques RAC875x KUKRI

Populations de TILLING utilisées pour induire des mutations dans le gène candidat UBP

Trois populations de TILLING ont été utilisées pour identifier des mutations sur la copie 3B du gène UBP et ses copies homéologues (3A et 3D) dans des fonds génétiques printemps et hiver, mais aussi l'effet cumulé de mutations des copies 3A et 3B dans un fond printemps. Dans les 3 populations, des mutations de type non-sens (codon stop), pouvant induire une protéine tronquée (effet délétère) ont été recherchées en priorité. A défaut, des mutations non-synonymes (codon muté) induisant un changement de conformation dans la protéine ont été sélectionnées.

Populations de blé d'hiver : nous avons utilisé deux populations de TILLING des variétés de blé d'hiver APACHE et KALAHARI composées respectivement de 5351 et 2304 lignées mutées par EMS (ethyl methanesulfonate). Le screening a été réalisé par capture et séquençage (Illumina MiSeq) des gènes ciblés.

Population blé de printemps européen : nous avons exploité la population TILLING de blé tendre de printemps CADENZA mutée par EMS. Cette population se compose de 1200 mutants dont les mutations ont été séquencées et répertoriées dans la base de données www.wheat-tilling.com (Krasileva et al 2017).

Population blé de printemps australien : nous avons criblé les 2000 lignées TILLING de la variété de printemps GLADIUS mutées par EMS à l'aide de la méthode CEL1 en collaboration avec l'Université de Sydney (Dong et al 2009, Plant Genome). Des mutations dans le gène UBP de type non-synonymes, ont été confirmées en amont du projet pour 23 lignées (7 lignées 3A, 6 lignées 3B et 10 lignées 3D) par séquençage SANGER. Les 23 lignées mutées ont été multipliées et croisées au cours du projet pour produire des doubles (3AB, 3BD, 3AD) et triple (3ABD) mutants.

Réseau expérimental

Un réseau expérimental de 30 essais mis en place entre 2019 et 2022 en France, Espagne, Etats-Unis et Australie sur 13 lieux ; en champ et sur la plateforme conditions contrôlées DroughtSpotter (cf. tableau ci-contre).

Chaque couple de lignée isogénique a été évalué sur une, deux ou trois années, avec pour objectif de mesurer l'effet du QTL qDHY.3BL sur le rendement en réponse au stress hydrique et thermique et à déterminer les conditions environnementales pour lesquelles le gène UBP a un effet positif, en particulier dans les blés européens. Pour des raisons agronomiques les essais réalisés en champ sur les blés de printemps (Australie, Espagne) et les blés d'hiver (Etats-Unis du nord, France), ont été menés séparément.

Chaque 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 même couple isogénique (cf. couples NIL des tableaux 1, 2 et 3). Sur chaque essai, des lignées témoins correspondantes aux lignées parentales utilisées pour créer le matériel ont également été évaluées. Les plans expérimentaux visant à évaluer la réponse au stress hydrique et thermique ont été conduits en 3 à 4 répétitions et avec une à deux modalités d'irrigation (sèche/DRY et irriguée/IRR) selon les lieux, et visant un stress hydrique post floraison.

Phénotypage

Sur chaque lieu, nous avons mesuré les composantes classiques de rendement : précocité (date d'épiaison à 50%), hauteur des plantes, humidité du grain, rendement à 15% d'humidité, poids de mille grains et sur certains lieux le poids spécifique et teneur en protéines du grain. Un bilan hydrique précis et une mesure des variables météo a permis de caractériser le type de stress rencontré. Sur le site de Gréoux-les-Bains un dispositif de phénotypage automatisé et l'usage de mesures effectués via des capteurs embarquées sur un drone ont permis d'acquérir les fractions de couverture verte, la hauteur et l'architecture fine du couvert, ainsi que la sénescence via des mesures de NDVI. Des minirhizotrons ont également été mis en place sur ce site pour accéder à la dynamique de croissance et d'estimer le volume racinaire des plantes.

Analyse des effets du matériel isogénique

Nous avons utilisé un script d'analyse des couples NILs, codé en 'R', développé durant le projet FSOV NIL-N par la société Biogemma. 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 Irrigué ou sec. 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%). Des visualisations graphiques de type boxplot ont également été produites sur les différentes variables à l'aide du logiciel TIBCO-SPOTFIRE version 12.0.3.

Analyse GWAS

Les lignées du panel étudié (220 blés élites européens de type hiver issus du projet BreedWheat), ont été

An- née	Génétique	Type NIL	Type	Nom couples NIL	Lieu	Pays	Provider	Modalités	Nb parcelles
2021	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118)	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL (2 dates de semis) x 4 rep	96 pots
2021	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	GREOUX- LES-BAINS	France	Arvalis	DRY/IRR x 3 rep	48
2020	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL x 4 rep	72 pots
2020	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	CHATEAUNEUF	France	Heliantis	DRY/IRR x 4 rep	64
2020	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	SAINT- BONNET- DE-MURE	France	Arvalis	DRY/IRR x 3 rep	48
2019	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	GREOUX- LES-BAINS	France	Arvalis	DRY/IRR x 3 rep	48
2019	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	PUSIGNAN	France	Arvalis	DRY/IRR x 4 rep	64
2019	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	WALLA WALLA	États-Unis	Limagrain	DRY/IRR x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CORDOBA	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	ENSAYOS- EN-ALBACETE	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	JEREZ	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CARMONA	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	64
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CORDOBA	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	32
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	ENSAYOS- EN-ALBACETE	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	32
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	JEREZ	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	32
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CARMONA	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	31
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CARMONA	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	27
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CORDOBA	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	32
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	DRY x 4 rep	32
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	64
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	WARWICK	Australie	UA	DRY x 4 rep	32
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	WARWICK	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	64
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	48
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-97-1314	WARWICK	Australie	UA	IRR x 4 rep	24
2019	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	64
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-97-1314	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL x 4 rep	72 pots
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-1314	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL (2 dates de semis) x 4	96 pots
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-1314	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ CONTROL x 4 rep	64 pots
2021	RAC x Absalon	BC	Hiver	RAC-R18- (03-07-08-09-19)	SAINT-PAUL- LES ROMANS	France	Heliantis	DRY/IRR x 4 rep	96
2021	RAC x Absalon	BC	Hiver	RAC-R18- (03-07-08-09-19)	WALLA WALLA	États-Unis	Limagrain	DRY/IRR x 4 rep	96

Tableau 4 : Liste des 30 essais réalisés de 2019 à 2022



génomées avec la puce à SNPs Affymetrix Axiom 280 K (Rimbert *et al.* 2018). Les locus hétérozygotes, les SNPs monomorphes, les SNPs dont la fréquence allélique mineure (MAF) était inférieure à 5% ont été écartés de l'analyse. Les données manquantes ont été imputées avec Beagle 4.1 (Browning and Browning 2016). L'analyse GWAS a été réalisée avec FaST-LMM v2.07 (Lippert *et al.* 2011). Après filtrage des données, 161 772 SNPs ont été testés sur les traits mesurés sur 210 variétés dans les quatre types d'environnement. Les études d'association SNP-caractère ont été réalisées avec le modèle mixte à locus unique (Yu *et al.* 2006).

► Caractérisation génétique des lignées NIL

Analyse du fond génétique et de la taille du QTL qDHY.3BL (RAC875) introgressé

La totalité du matériel végétal isogénique disponible a été caractérisé génétiquement en utilisant la technique de génotypage haut débit, Illumina Axiom avec une puce 20K développée par la société Limagrain (données et marqueurs confidentiels). Ce marquage a permis de contrôler le niveau d'homologie du fond génétique en dehors de la zone d'intérêt (objectif 95% d'homologie) ainsi que de mesurer la taille du fragment du QTL d'intérêt introgressé. Des visualisations graphiques de chaque couple isogénique ont été mise en place afin de confirmer l'état d'homogénéité de chaque chromosome. Ces visualisations ont été réalisées à l'aide du logiciel TIBCO Spotfire version 12.0.3.

Génotypage de SNP par la méthode KASPar

Les SNP utilisés dans cette étude 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.

► Identification de la variabilité allélique naturelle

L'intervalle de confiance du QTL qDHY.3BL contient 8 gènes qui sont également présents sur les homéologues 3A et 3D. L'identification de la variabilité a été effectuée sur les 21 gènes candidats (7 sur le chr3A, 8 sur chr3B et 6 sur chr3D).

TraesCS3B01G570900	TraesCS3A01G505200	TraesCS3D01G623100LC
TraesCS3B01G571000	TraesCS3A01G505100	TraesCS3D01G512400
TraesCS3B01G572500	TraesCS3A01G505300	TraesCS3D01G512500
TraesCS3B01G572600	TraesCS3D01G512600	
TraesCS3B01G572700	TraesCS3A01G505300	TraesCS3D01G512500
TraesCS3B01G572800		
TraesCS3B01G572900	TraesCS3A01G505400	TraesCS3D01G512700
TraesCS3B01G573000	TraesCS3A01G505500	TraesCS3A01G684600LC

Tableau 5 : Liste des 21 gènes candidats homéologues 3A,B,D

Le séquençage de ces 21 gènes sur un panel de 528 blés d'hivers a été effectué par la technologie « NimbleGen Sequence Capture » en phase liquide puis séquençage par Illumina MiSeq selon un protocole interne Limagrain. Ce panel de 458 lignées était constitué de 450 lignées, représentant la variabilité mondiale des blés d'hiver (Core Collection INRA /projet BreedWheat) et de 78 lignées de blé sélectionnées pour représenter la variabilité des panels européens (lignées déjà

phénotypées dans le projet BreedWheat en condition de stress azoté et hydrique).

Un second jeu de données de séquençage shot-gun du génome de 16 variétés de blés (Edwards et al 2012) a été utilisé pour analyser la variabilité des blés de printemps sur ces 21 gènes. A l'aide des variants identifiés, un set de marqueurs KASPar a été utilisé pour génotyper un panel de 627 variétés représentant la diversité mondiale des blés de printemps.

► Analyse d'expression des gènes du QTL qDHY.3BL en conditions de stress hydrique et thermique

L'analyse de l'expression génique a été réalisée par séquençage d'ARN stranded (séquençage orienté pleine longueur) sur un total de 48 échantillons. Ces échantillons ont été réalisés sur 4 lignées NILs issues de 2 couples isogéniques : 1314 A-B et 2164 A-B. Les ARN ont été extraits sur des plantes cultivées en conditions contrôlées sur la plateforme DroughtSpotter de l'UA selon deux modalités de stress hydrique (WW : well watered et D: Drought), à 3 et 10 jours après l'application du stress et en 3 répliques techniques sur un échantillon de feuilles prélevé sur la feuille drapeau. Soit 4 lignées x 2 temps (3j/10j) x 2 traitements (WW/D) x 3 échantillons = 48 échantillons. Après un test de qualité de l'ARN, le séquençage a été réalisé sur la plateforme NovaSeq6000 et les données obtenues analysées pour identifier les gènes différentiellement exprimés entre les conditions de traitement et les différentes dates après le début du stress hydrique, à l'aide d'un pipeline interne utilisant le package d'analyse DESeq2 version : 1.42.0.

3 Résultats et Discussion

► Étude de la variabilité allélique naturelle du gène UBP chez le blé d'hiver et de printemps

Les 8 gènes candidats du chromosome 3B de la zone du QTL qDHY.3BL et leurs gènes orthologues sur les chromosomes 3A et 3D ont été séquencés par séquence capture sur un panel de 528 lignées de blé d'hiver incluant les parents des populations (RAC875, Altigo, Absalon, Kukri), puis par séquençage d'Exome sur un Panel de 250 lignées de blé Limagrain (panel confidentiel). Ce séquençage a permis de mettre en évidence 2321 variants de type SNP dans la zone du chromosome 3B de 802846473 bp à 804009874 bp. Dans la zone couverte par le gène candidat UBP (TraesCS3B01G572900), nous avons identifié 42 variants, dont 30 dans le gène et 12 dans la région promotrice de 2 kb en 5' du gène. Une annotation fonctionnelle des 30 variants de la région génique a permis d'identifier : 6 variants 3' UTR, 3 variants 5' UTR, un variant intronique, 18 variants synonymes et 2 variants non synonymes (p.Ala297Pro en position 803628975 et p.Val296Ala en position 803628977) situés tous deux dans l'exon 2 du gène. L'analyse fine des données de couverture de séquençage a également confirmé que le gène UBP n'était pas dupliqué.

La région promotrice étant par définition non ou mal couverte par la capture (définie sur le CDS du gène), nous avons complété le jeu de données par un séquençage SANGER de la région promotrice (environ 4500 bp en 5' du gène) sur les parents RAC 875, Altigo et Absalon.

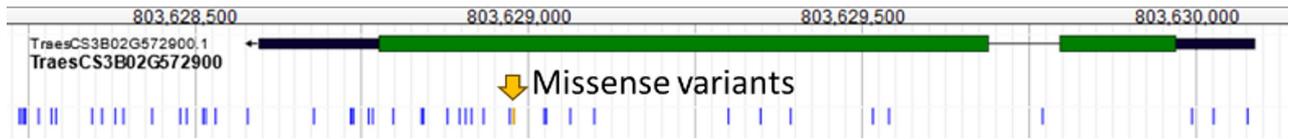


Figure 1 : représentation graphique des 30 variants identifiés dans le gène UBPA (TraesCS3B01G572900), SNP synonymes en bleu, SNP non synonymes (missense) en jaune

L'analyse des 42 variants de la zone, n'a mis en évidence aucun polymorphisme entre le parent tolérant à la sécheresse RAC875 versus les parents Absalon et Altigo. Cependant, ils étaient tous polymorphes entre RAC875 et la lignée sensible printemps Australienne Kukri. L'analyse du promoteur, n'a pas non plus mis en évidence de polymorphismes spécifiques entre RAC875 et Absalon/Altigo. Nous avons cependant retrouvé le polymorphisme du SNP ADW595 entre RAC875 et Kukri, identifié par l'UA. En effet, ce SNP ADW595 positionné dans la région promotrice du gène (A to T variant at position chr3B :803634611 bp) a été proposé comme pouvant être le polymorphisme causal du gène candidat UBPA responsable de l'effet du QTL qDHY.3BL par Thomelin *et al.* 2021. Les variants de la zone, incluant le variant ADW595 étaient tous liés entre eux et portaient l'allèle variant, de type RAC875, sur 280 individus du panel étudié, soit une fréquence élevée de 55.34% et seulement 2 haplotypes observés au sein des blés d'hiver séquencés.

En parallèle, l'UA a réalisé la même analyse par génotypage de deux SNP (ADW594 et ADW595) sur un panel de 627 lignées de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Ce travail a permis de mettre également en évidence une fréquence élevée de l'allèle RAC875 en Australie et en Europe (Thomelin et al 2021).

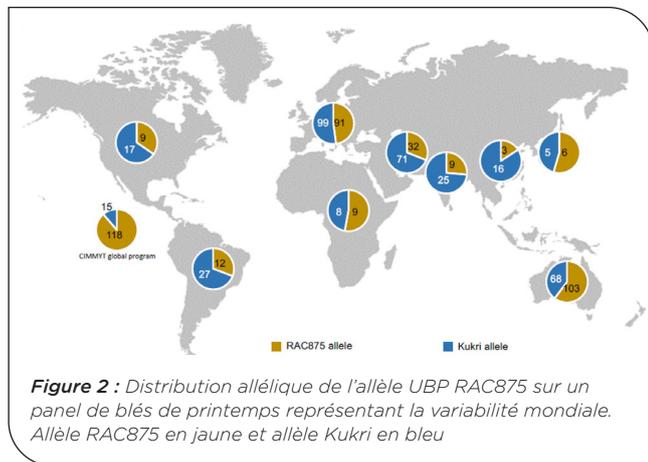


Figure 2 : Distribution allélique de l'allèle UBPA RAC875 sur un panel de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Allèle RAC875 en jaune et allèle Kukri en bleu

A partir des SNP identifiés par séquençage, un sous set de 21 variants, couvrant le gène UBPA, a été génotypé par la méthode KASPar sur un panel composé de blés élites européens de type hiver. Ce matériel, avait déjà été évalué en champ sur 3 années avec 26 essais, dans le projet BreedWheat dans des environnements sous contraintes abiotiques, dont notamment 6 essais présentant un stress hydrique avéré (travaux de Touzy et al 2019). Une analyse GWAS (161K SNP Axiom + 21 SNP UBPA) a été effectuée selon deux méthodes : par environnement et multi-environnement classifiés selon l'analyse des indices de stress hydrique et tels que décrits dans la figure ci-contre.

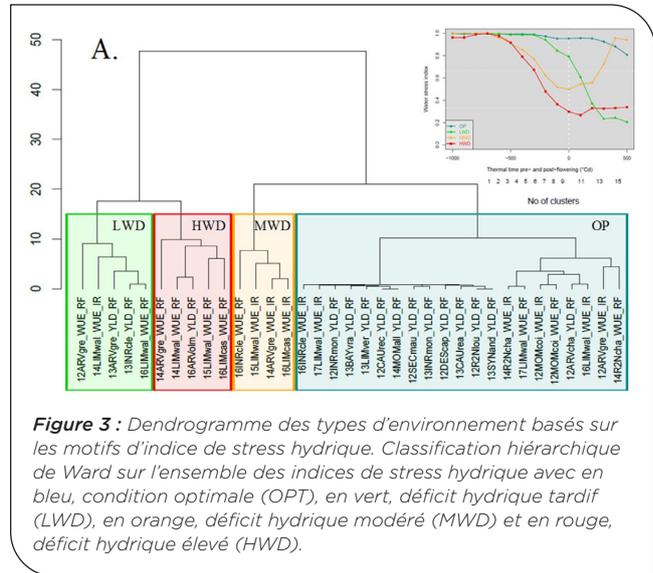


Figure 3 : Dendrogramme des types d'environnement basés sur les motifs d'indice de stress hydrique. Classification hiérarchique de Ward sur l'ensemble des indices de stress hydrique avec en bleu, condition optimale (OPT), en vert, déficit hydrique tardif (LWD), en orange, déficit hydrique modéré (MWD) et en rouge, déficit hydrique élevé (HWD).

L'analyse des données de rendement (GY), précocité de floraison (DOE) et poids de mille grains (TKW), n'ont pas permis de mettre en évidence de région associée à la tolérance au stress hydrique et thermique sur le chromosome 3B (seuil : $-\log_{10}(Pvalue) > 3$), et tout particulièrement dans la région du gène UBPA, quelle que soit la méthode testée. Le Manhattan plot ci-dessous présente les résultats obtenus avec la méthode par environnement, au niveau du chromosome 3BL et du QTL qDHY.3B matérialisé par la flèche rouge.

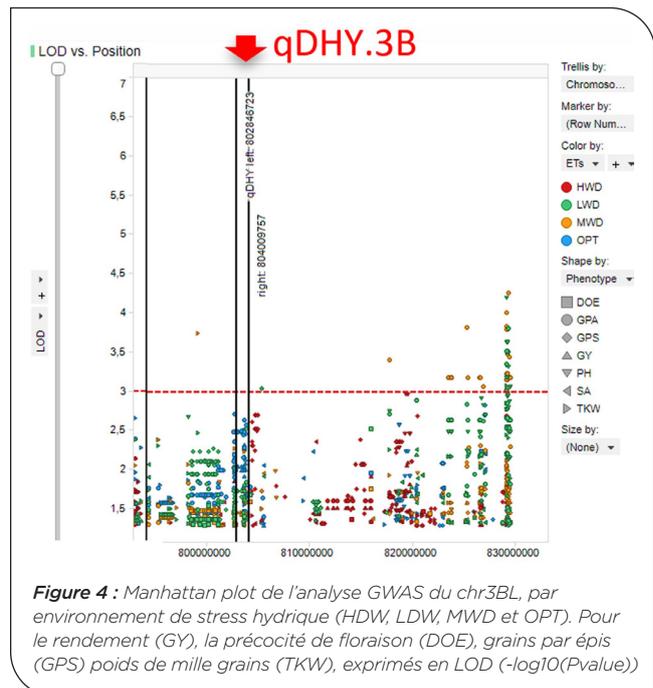


Figure 4 : Manhattan plot de l'analyse GWAS du chr3BL, par environnement de stress hydrique (HDW, LDW, MWD et OPT). Pour le rendement (GY), la précocité de floraison (DOE), grains par épis (GPS) poids de mille grains (TKW), exprimés en LOD ($-\log_{10}(Pvalue)$)

► **Identification de variabilité allélique induite dans le gène UBP dans des populations de TILLING**

Quatre populations de TILLING ont été exploitées pour identifier des mutations sur les copies 3A/3B/3D du gène UBP dans des fonds génétiques printemps (GLADIUS et CADENZA) et hiver (APACHE et KALAHARI).

Aucune mutation STOP n'a pu être détectée dans la population CADENZA, nous avons seulement identifié des mutations non-synonymes de moindre intérêt pour la validation fonctionnelle de ce gène. Dans les populations APACHE et KALAHARI, malgré des efforts conséquents de screening par séquençage et de validation des mutations par la méthode KASPAR, nous n'avons identifié que trois mutations STOP sur la copie homéologue UBP_3A (TraesCS3A01G505400) et une mutation du site d'épissage de l'intron du gène candidat UBP_3B, décrites dans le tableau ci-dessous.

Population	Mutant ID	Gène	Chrom.	Impact	Mutation type
Apache	APB_3843	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_302	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_177	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_196	TraesCS3B01G572900	3B	HIGH	splice_intron_variant

Tableau 6 : Liste des mutants TILLING type hiver identifiés

Pour toutes ces mutations, nous avons sélectionné et multiplié des plantes homozygotes mutantes et sauvages (de type lignées isogéniques).

Dans la population GLADIUS, l'UA a fixé et multiplié les plantes portant les deux mutations STOP identifiées en amont de ce projet dans le gène UBP_3B (TraesCS3B01G572900). Il n'a pas été possible non plus d'obtenir des doubles et triples mutants fertiles

en croisant ces mutants avec d'autres mutants STOP sur les copies 3A et 3D (TraesCS3A01G505400 et TraesCS3D01G512700).

► **Caractérisation phénotypique de la variabilité induite et naturelle chez le blé d'hiver et de printemps en conditions naturelles et contrôlées**

L'objectif de cette partie était de confirmer l'effet positif des allèles du QTL qDHY.3B sur le rendement en condition de stress hydrique et thermique dans un blé d'hiver français et d'étudier l'effet des nouveaux allèles induits par mutagenèse des blés d'hiver et de printemps, ainsi que de tenter de décrire les mécanismes physiologiques.

Concernant les mutations induites dans le matériel hiver et printemps, les quantités de semences produites pour les mutants étant trop faibles, il n'a pas été possible de phénotyper les mutants durant ce projet.

La validation de la variabilité naturelle (Allèle RAC875 du QTL qDHY.3B) sur le rendement en condition de stress hydrique et thermique a été réalisée par l'évaluation de lignées quasi-isogéniques (NIL) dans des fonds hiver et printemps, par construction de type HIF (Heterogenous Inbred Families) et BC (Backcross).

Dans un premier temps nous avons évalué la qualité du matériel génétique produit par génotypage moléculaire (18 000 SNP) et analyse de similarité des couples isogéniques. Pour tous les couples NIL retenus dans cette étude, nous avons pu démontrer que la distance génétique entre les couples isogéniques était inférieure à 0.1 (distance génétique de Roger), comme c'est le cas dans l'exemple présenté ci-contre (figure 5) sur le matériel isogénique RAC875 x KUKRI, dans le fond printemps. Une analyse similaire sur le matériel RAC875 x ABSALON (de type NIL BC) a permis de confirmer que toutes les lignées isogéniques étaient proches de leur parent récurrent ABSALON avec une distance de Roger comprise entre 0.059 et 0.172, ce qui est très satisfaisant pour ce type de construction.

A)

	KUKRI	RAC 875	NIL1_1056A	NIL2_1056B	NIL3_2164A	NIL4_2164B	NIL5_97A	NIL6_97B	NIL7_1314A	NIL8_1314B
KUKRI	0	0.751	0.499	0.495	0.488	0.485	0.525	0.525	0.512	0.518
RAC 875	0.751	0	0.558	0.563	0.57	0.572	0.536	0.534	0.546	0.541
NIL1_1056A	0.499	0.558	0	0.102	0.57	0.569	0.443	0.437	0.52	0.522
NIL2_1056B	0.495	0.563	0.102	0	0.567	0.564	0.452	0.441	0.517	0.519
NIL3_2164A	0.488	0.57	0.57	0.567	0	0.112	0.592	0.589	0.564	0.566
NIL4_2164B	0.485	0.572	0.569	0.564	0.112	0	0.584	0.58	0.561	0.565
NIL5_97A	0.525	0.536	0.443	0.452	0.592	0.584	0	0.118	0.539	0.545
NIL6_97B	0.525	0.534	0.437	0.441	0.589	0.58	0.118	0	0.544	0.548
NIL7_1314A	0.512	0.546	0.52	0.517	0.564	0.561	0.539	0.544	0	0.097
NIL8_1314B	0.518	0.541	0.522	0.519	0.566	0.565	0.545	0.548	0.097	0

B)

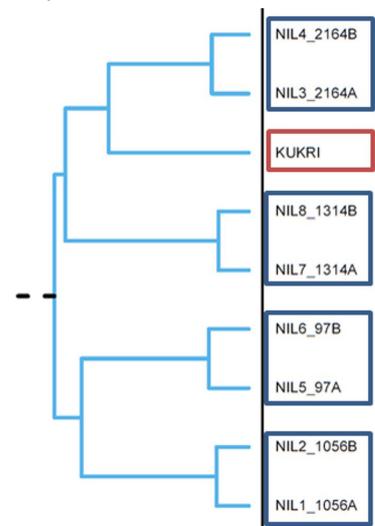


Figure 5 : Évaluation de la distance génétique entre les couples NIL du matériel isogénique RAC875 x KUKRI dans le fond printemps (A). Distance génétique de Roger (B) Clustering dendrogram

Pour tous les couples isogéniques, les marqueurs moléculaires spécifiques de la lignée RAC875, développés en début de projet, ont permis de confirmer que les couples portaient les versions alléliques attendues (c'est-à-dire allèle RAC875 versus l'allèle sensible des receveurs).

Les différents locus Vrn (Vernalization) et Ppd (Photoperiode) connus pour jouer un rôle important dans la régulation de la floraison chez le blé ont été caractérisés chez toutes les lignées NIL à l'aide d'un set de marqueurs moléculaires (set de marqueurs confidentiels Limagrain). Ils ont permis de confirmer que les NIL HIF RAC875x KUKRI étaient de type printemps et les lignées RAC875x ALTIGO de type hiver. Nous avons cependant mis en évidence quelques variations au niveau de certains locus Vrn et Ppd mais sans qu'il y ait de divergences au sein d'un même couple de lignées isogéniques. Les lignées HIF BC RAC875 x ABSALON étaient toutes de type hiver et parfaitement fixées aux allèles du parent récurrent ABSALON.

Caractérisation des lignées NIL RAC875 x ALTIGO, fond hiver européen.

Les trois couples de lignées isogéniques de type HIF ont été évalués en champ sur 6 lieux de 2019 à 2021 en France et Etats-Unis dans des environnements soumis à différents stress hydriques (conditions optimales irriguées ou sèches). Sur ces différents essais, nous n'avons pas réussi à démontrer l'effet positif des lignées isogéniques portant l'allèle RAC875, sur le rendement en condition de stress hydrique. Au contraire, sur certains lieux, cet allèle semble apporter un effet négatif en condition stressée (non irriguée). A titre d'illustration, c'est ce qui a été observé sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021, sur lequel un stress hydrique en condition non irriguée a été confirmé à partir du stade floraison, via un calcul d'indice de stress hydrique (cf. figure ci-dessous) et une perte de rendement de 22.3 q/ha entre les deux conditions.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 7 ci-contre, sur les 3 couples testés, nous n'observons pas d'effet

positif sur le rendement (GY 15%) en condition de stress hydrique, sur les lignées portant l'allèle RAC875 (Q3B+ / en rouge) versus les lignées portant l'allèle ALTIGO (Q3B- / en bleu) au QTL. Nous observons au contraire une baisse de rendement moyen de -4.1 et -4.2 q/ha pour les deux couples NIL RAAL_Q3B_056.2 et 118.2, et un écart non significatif pour le couple 153.2.

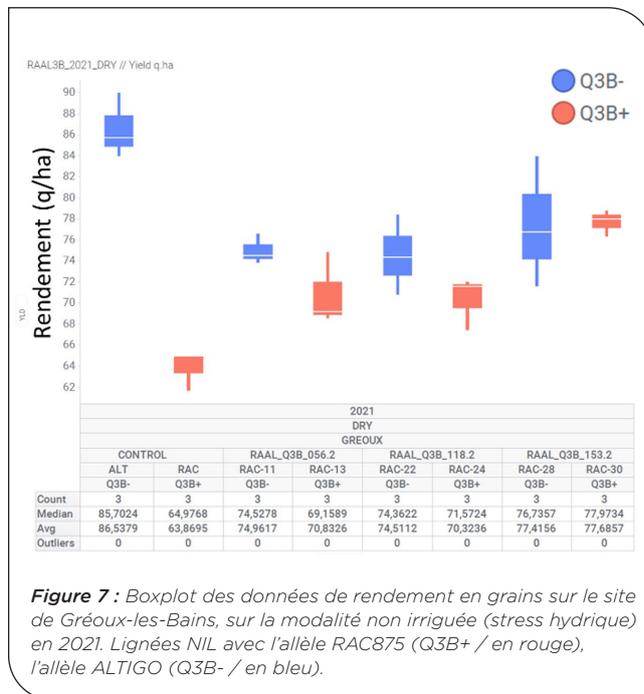


Figure 7 : Boxplot des données de rendement en grains sur le site de Gréoux-les-Bains, sur la modalité non irriguée (stress hydrique) en 2021. Lignées NIL avec l'allèle RAC875 (Q3B+ / en rouge), l'allèle ALTIGO (Q3B- / en bleu).

À la suite de ces observations, il ne nous a pas semblé pertinent d'exploiter les données générées par le dispositif de phénotypage automatisé de Gréoux-les-Bains (fractions de couverture verte, mesures de sénescence NDVI, etc...), ni les données des minirhizotrons, mis en place sur ce site, pour explorer le développement racinaire et tenter de décrire les mécanismes physiologiques sous-jacents du QTL qDHY.3BL, alors que l'effet du QTL n'était pas visible.

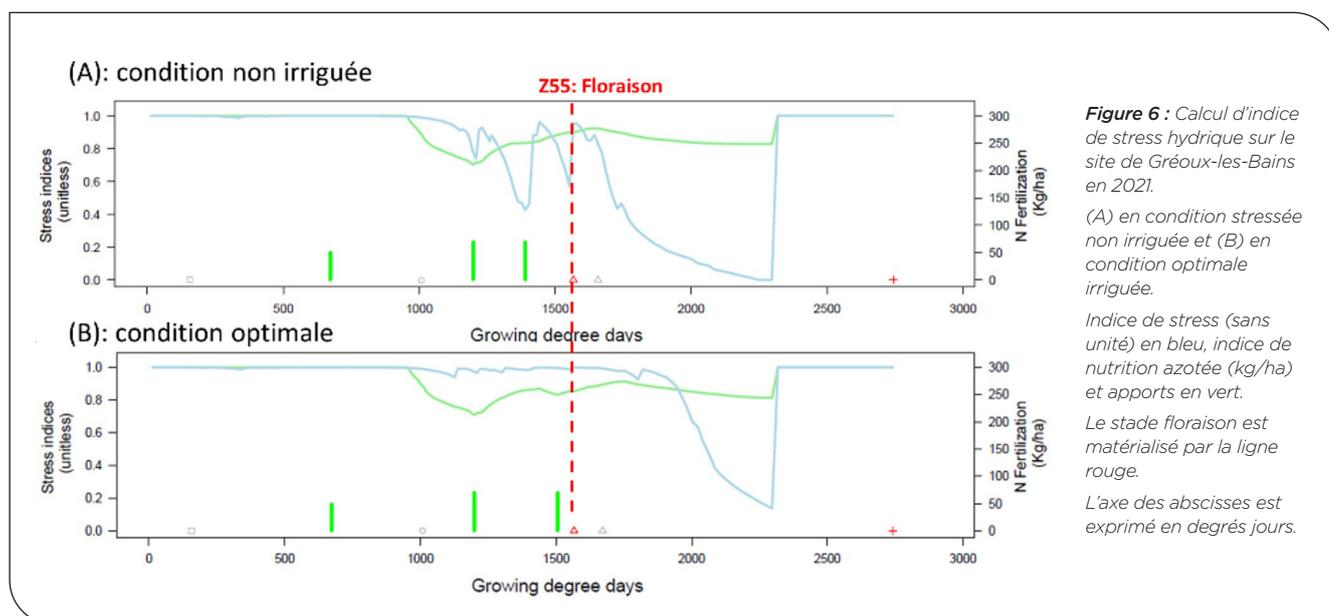


Figure 6 : Calcul d'indice de stress hydrique sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021.

(A) en condition stressée non irriguée et (B) en condition optimale irriguée.

Indice de stress (sans unité) en bleu, indice de nutrition azotée (kg/ha) et apports en vert.

Le stade floraison est matérialisé par la ligne rouge.

L'axe des abscisses est exprimé en degrés jours.

Caractérisation des lignées NIL RAC875 x ABSALON, fond hiver européen.

Les cinq couples de lignées isogéniques de type HIF et deux lignées parentales, produits en fin de projet, ont été évalués en champ sur seulement 2 lieux en 2021 en France et Etats-Unis dans des environnements soumis à un stress hydriques (conditions optimales irriguées ou sèches non irriguées).

Bien que ces couples de lignées isogéniques soient très proches génétiquement du parent récurrent ABSALON, l'analyse des effets a été réalisée par comparaison des couples isogéniques. Sur les deux lieux étudiés (figure 8), nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'effet positif significatif de l'allèle RAC875 sur le site de Walla walla (A) et Saint-Paul-les-Romans (B).

Les résultats au champ, obtenus sur les lignées isogéniques RAC875 x ALTIGO et ABSALON semblent vouloir démontrer que l'effet du QTL qDHY.3BL n'est pas significatif dans le fond génétique des blés d'hiver européens et les environnements testés dans cette étude.

Caractérisation des lignées NIL RAC875 x KUKRI, fond printemps australien.

Les 3 couples de lignées isogéniques de type HIF et les deux lignées parentales ARC875 et KUKRI, développés par l'UA ont été évalués sur 17 lieux en Australie et en Espagne entre 2019 et 2022 dans des environnements soumis à un stress hydriques et thermique (conditions optimales irriguées ou sèches non irriguées situées parfois sur des lieux différents).

Sur les 10 essais réalisés en Espagne du Sud, nous avons observé des variations de l'effet de l'allèle RAC875 sur le rendement, en fonction des lieux, années et environnement (tableau 7A). En condition stressées, nous avons mesuré des variations de rendement positives et négatives (tableau 7B) entre les deux allèles RAC875 et KUKRI. Ces variations pouvant aller par exemple de +3.8 à -3.1 q.ha pour le couple NIL 2164, qui présente en moyenne des pertes de rendement en condition optimale irriguée.

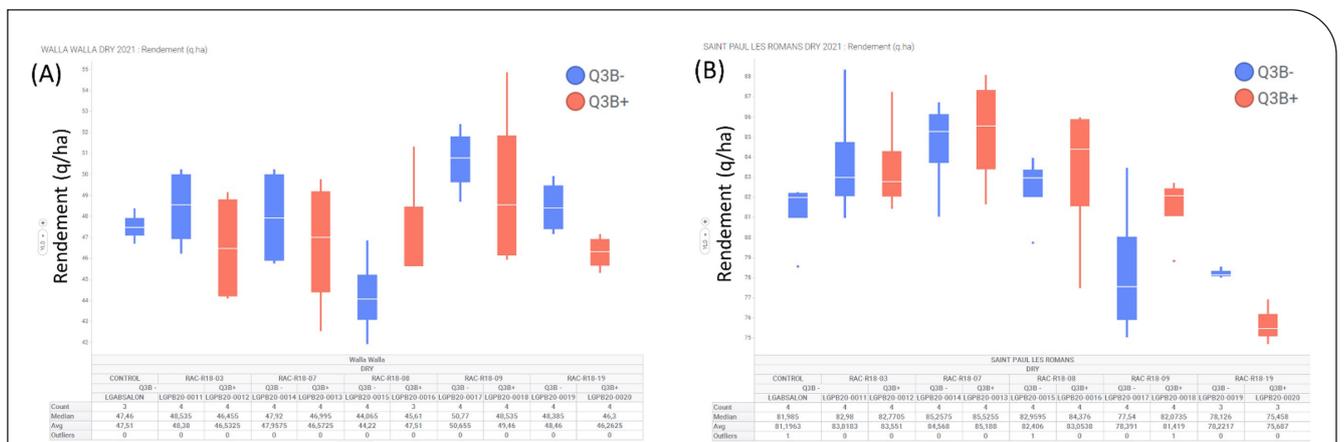


Figure 8 : Boxplot des données de rendement en grains sur le site de (A) Walla walla et (B) Saint-Paul-les-Romans, sur la modalité non irriguée (stress hydrique) en 2021. Lignées NIL avec l'allèle RAC875 (Q3B+ / en rouge), l'allèle ABSALON (Q3B- / en bleu).

A) Condition	Stressé (DRY)					Optimal (IRR)						
	Année	2020	2021	2021	2022	2022	Année	2020	2021	2021	2022	2022
Lieu	CAR	CAR	JER	CAR	JER	COR	COR	PA-ALB	COR	PA-ALB	COR	PA-ALB
individual	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD
RAC875	32,5	10,2	44,1	38,6	48,2	58,7	77,7	90,0	62,2	92,3	62,2	92,3
KUKRI	23,9	7,3	37,1	35,6	41,7	52,1	66,1	89,1	62,5	75,7	62,5	75,7
2164A	31,3	9,1	45,9	33,3	49,2	64,6	77,2	86,4	66,6	83,4	66,6	83,4
2164B	34,4	9,9	42,1	31,8	46,8	61,5	82,6	96,1	67,0	86,7	67,0	86,7
97A	25,3	7,0	40,0	36,3	37,7	54,8	66,1	85,5	49,1	82,9	49,1	82,9
97B	24,9	6,9	35,1	34,8	36,2	55,3	64,6	83,6	47,8	81,9	47,8	81,9
1314A	39,3	13,5	43,7	31,2	44,5	64,1	81,0	93,4	64,3	83,8	64,3	83,8
1314B	38,0	13,0	44,9	32,3	43,0	64,7	78,8	88,9	60,8	83,2	60,8	83,2

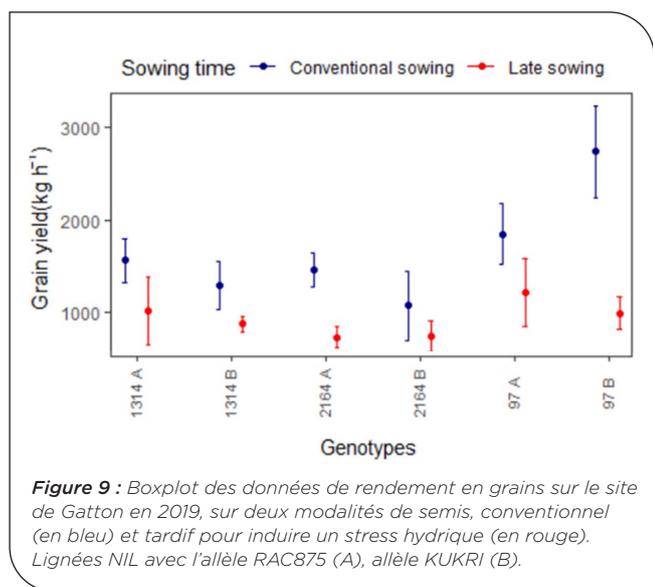
B) Condition	Stressé (DRY)					Optimal (IRR)						
	Année	2020	2021	2021	2022	2022	Année	2020	2021	2021	2022	2022
Lieu	CAR	CAR	JER	CAR	JER	COR	COR	PA-ALB	COR	PA-ALB	COR	PA-ALB
Couple NIL	Effet rendement moyen en q.ha (allèle RAC875 - allèle KUKRI)											
Parents	8,6	2,9	7,0	3,1	6,4	6,7	11,7	0,9	-0,3	16,6	-0,3	16,6
2164	-3,1	-0,8	3,8	1,5	2,4	3,1	-5,4	-9,7	-0,4	-3,3	-0,4	-3,3
97	0,4	0,1	4,9	1,5	1,5	-0,6	1,5	1,8	1,3	1,0	1,3	1,0
1314	1,3	0,5	-1,2	-1,1	1,5	-0,6	2,2	4,5	3,5	0,6	3,5	0,6

Tableau 7 : Rendement moyen (q.ha) des lignées RAC875 x KUKRI sur les 10 essais espagnols en condition stressée (DRY) et non stressée (IRR). (A) rendement moyen sur les 4 répétitions, (B) Différence de rendement entre l'allèle A (RAC875) et l'allèle B (KUKRI), positifs en vert, négatif en rouge et non significatifs en bleu.



Nous avons donc pu mettre en évidence un effet du QTL, mais il semble variable entre les couples et les environnements testés, ce qui semble vouloir démontrer un manque de stabilité du QTL dans les environnements stressés.

Des essais similaires conduits en Australie sur 7 essais, à Gatton et Warwick, tendent à démontrer les mêmes conclusions sur la stabilité du QTL. C'est par exemple le cas de l'essai de Gatton en 2019 (cf. figure 9, ci-dessous), où l'on peut observer des effets sur le rendement assez variables d'un couple NIL à l'autre avec des effets peu significatifs de l'allèle RAC875 en condition de stress thermique (semis tardif), en rouge. Nous pouvons également remarquer qu'en condition de stress hydrique, le rendement moyen est généralement compris entre 8 et 12 q.ha.

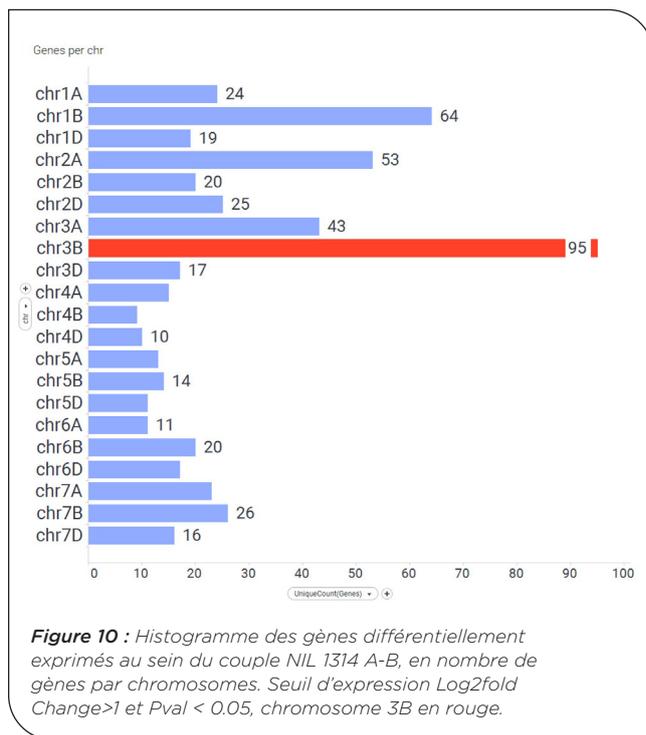


► Analyse d'expression des gènes du QTL qDHY.3BL en conditions de stress hydrique et thermique

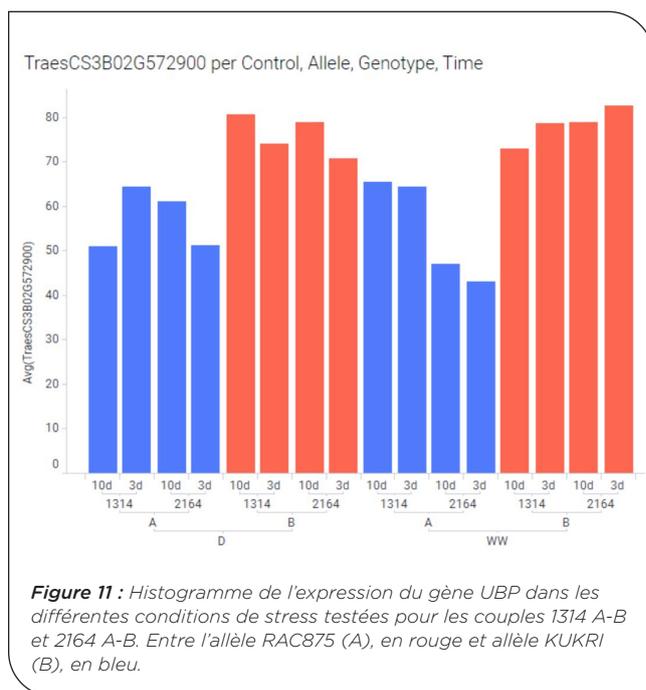
L'analyse de l'expression par séquençage d'ARN avait pour objectif de confirmer l'expression différentielle du gène UBP vis-à-vis de sa réponse au stress, mis en évidence par Thomelin *et al.* 2021 par qPCR et de documenter tous les gènes différentiellement exprimés afin de tenter d'identifier les processus biologiques et voies métaboliques affectées par l'allèle UBP présent chez RAC875.

Nous avons séquéncé le 2 couples isogéniques : 1314 A-B et 2164 A-B (lignées printemps australiennes), selon deux modalités de stress hydrique (WW : irrigation optimale et D : stressé), à 3 et 10 jours après l'application du stress. L'analyse des données de séquençage d'ARN a permis d'identifier 79 309 gènes exprimés (High Conf: 60 345 + Low Conf: 18 964 gènes) dans nos conditions expérimentales. L'analyse du score Log2foldChange a mis en évidence 571 gènes différentiellement exprimés (allèle RAC875 vs KUKRI ; seuil Log2foldChange>1 et pval < 0.05), au sein du couples NILs 1314, en condition de stress hydrique à J+10. Ces gènes sont répartis sur les 21 chromosomes avec, une prédominance sur le chromosome 3B (95 gènes), 3A, 2A, 1B (cf. figure 10). Cependant, il est possible que ces régions différentiellement exprimées soient plus liées à la

construction isogénique imparfaite des lignées NIL, plutôt qu'à des gènes régulés par l'expression du gène UBP_3B.



L'analyse de l'expression du gène UBP_3B (TraesCS3B01G572900), a démontré une variation d'expression assez faible entre les allèles RAC875 et KUKRI : Log2fold Change de 0,63 et pval de 0.03. Cependant, malgré le manque de significativité nous confirmons une légère sous expression du gène UBP portant l'allèle RAC875 (en bleu), avec un différentiel non significatif entre les conditions de stress (D et WW) appliquées lors de cette expérimentation (cf. figure 11).



4 Conclusion

Malgré un contexte très complexe lié au COVID et à des réorganisations chez deux des partenaires, la collaboration entre Limagrain, l'université d'Adélaïde et Arvalis l'institut du végétal a permis de disséquer en profondeur le QTL qDHY.3BL, identifié par l'UA dans le cadre des travaux de thèse de J. Bonneau (Bonneau *et al.* 2013). Ce projet est un bel exemple de collaboration internationale et une illustration de la continuité du projet ANR BreedWheat (ANR-10-BTBR-03) dont une partie des données génotypique et phénotypiques ont pu être exploitées pour réaliser une analyse GWAS. Les différents volets de ce projet ont permis d'étoffer les connaissances de ce locus et d'évaluer l'intérêt de ce QTL détecté initialement dans le blé de printemps pour l'amélioration des blés d'hiver européens vis-à-vis de tolérance au stress hydrique et thermique qui représente un des défis de demain pour l'agriculture.

La caractérisation de la variabilité allélique du gène candidat UBP_3B a permis de démontrer que les allèles de ce locus (version RAC875, tolérant) étaient déjà présents à une fréquence élevée dans le matériel français et européen des blés d'hiver. Les nombreux essais mis en place tendent à démontrer que l'effet de ce QTL dans les blés d'hiver a un impact très modéré voire négatif et qu'il présente une faible stabilité dans les environnements évalués. Nous avons cependant pu confirmer une tendance positive des effets du QTL dans les blés de printemps en Europe, cependant le potentiel de rendement étant plus élevé en conditions de stress hydrique en Europe, 25 à 50 q.ha versus 8 à 12 q.ha en Australie, il semble plus difficile de mettre en évidence et valoriser l'effet de ce QTL dans les environnements actuels européens.

La validation fonctionnelle du gène candidat UBP_3B par l'utilisation de mutations induites n'a pas pu être réalisée au cours de ce projet, mais plusieurs mutants ont été identifiés et multipliés en vue de cet objectif.

Des expérimentations complémentaires et analyses des données produites (Expérimentations DroughtSpotter, mesure des flux de sèves ou architecture racinaire) pourraient s'avérer nécessaires pour évaluer les mécanismes physiologiques sous-jacents mis en place dans le mécanisme de tolérance de ce QTL, mais les données de séquençage d'ARN ont confirmé des variations d'expression du gène candidat UBP.

D'un point de vue scientifique et méthodologique, ce projet propose différentes approches, analyses, technologies et dispositifs expérimentaux qui pourront être utilisés pour valider d'autres QTL identifiés pour d'autres caractères d'intérêt agronomique.

Ce projet a également permis de fournir un catalogue de lignées isogéniques printemps et hiver susceptibles d'être rapidement exploités dans des programmes de sélection variétale ainsi que des marqueurs moléculaires pour suivre le QTL. Enfin, une publication a pu être réalisée en utilisant une partie des données produites dans ce projet, dans la revue *Journal of Experimental Botany*, en 2021 (Thomelin *et al.* 2021).



Photo 1 : expérimentation « wheelie bins », Adélaïde (Australie) 2020.



Photo 2 : expérimentation « Drought Spotter », Urrbrae (Australie) 2022

Références bibliographiques

- Browning BL., Browning SR.** 2016. Genotype imputation with millions of reference samples. *Am J Hum Genet* 98:116-126.
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P.** 2010. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 61: 3211.
- Fleury D, Himanen K, Cnops G, Nelissen H, Boccardi TM, Maere S, Beemster GT, Neyt P, Anami S, Robles P, Micol JL, Inze D, Van Lijsebettens M.** 2007. The Arabidopsis thaliana homolog of yeast BRE1 [an E3 ligase] has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. *Plant Cell* 19: 417.
- François Postic.** Test et apports d'outils de phénotypage racinaires directs (imagerie des racines) et indirects (méthode électrique capacitive) pour une utilisation en sélection variétale au champ : application au blé. Thèse Arvalis, Université d'Avignon, 2016.
- Gouache D, Le Bris X, Bogard M, Deudon O, Pagé C, Gate P.** 2012. Evaluating agronomic adaptation options to increasing heat stress under climate change during wheat grain filling in France. *European Journal of Agronomy* 39, pp. 62-70
- Lippert C., Listgarten J., Liu Y., Kadie CM., Davidson RI., Heckerman D.** 2011. FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat Methods* 8:833-835.
- Parent B, Bonneau J, Maphosa L, Kovalchuk A, Langridge P, Fleury D.** 2017. Quantifying wheat sensitivities to environmental constraints to dissect G x E interactions in the field. *Plant Physiology* pp. 00372.
- Parent B, Shahinnia F, Maphosa L, Berger B, Rabie H, Chalmers K, Kovalchuk A, Langridge P, Fleury D.** 2015. Combining field performance with controlled environment plant imaging to identify the genetic control of growth and transpiration underlying yield response to water deficit stress in wheat. *Journal of Experimental Botany* 66: 5481.
- Rimbert H., Darrier B., Navarro J., Kitt J., Choulet F., Leveugle M., Duarte J., Rivière N., Eversole K., Le Gouis J., on behalf The BreedWheat Consortium, on behalf The BreedWheat Consortium, Davassi A., Balfourier F., Le Paslier M-C., Berard A., Brunel D., Feuillet C., Poncet C., Sourdille P., Paux E.** 2018. High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat.
- Schoppach R, Taylor JD, Majerus E, Claverie E, Baumann U, Suchecki R, Fleury D, Sadok W.** 2016. High resolution mapping of traits related to whole-plant transpiration under increasing evaporative demand in wheat. *Journal of Experimental Botany* 67: 2847.
- Shahinnia F, Le Roy J, Laborde B, Sznajder B, Kalambettu P, Mahjourimajd S, Tilbrook J, Fleury D.** 2016. Genetic association of stomatal traits and yield in wheat grown in low rainfall environments. *BMC Plant Biology* 16: 150.
- Thomelin P, Bonneau J, Brien C, Suchecki R, Baumann U, Kalambettu P, Langridge P, Tricker P, Fleury D.** 2021. The wheat Seven in absentia gene is associated with increases in biomass and yield in hot climates. *Journal of Experimental Botany* 4, 3774-3791.
- Thomas M, Pingault L, Poulet A, Duarte J, Throude M, Faure S, Pichon JP, Paux E, Probst AV, Tatout C** 2014. Evolutionary history of Methyltransferase 1 genes in hexaploid wheat. *BMC Genomics* 15:922.
- Thomelin P,** "Progress toward the positional cloning of qDHY.3BL, a QTL associated with yield variation in hot climate in bread wheat". Thèse de doctorat, Université d'Adélaïde. 2020.
- Touzy G., Rincet, R., Bogard, M., Lafarge, S., Dubreuil, P., Mini, A., ... & Praud, S.** 2019. Using environmental clustering to identify specific drought tolerance QTLs in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 2859-2880.
- Touzy G,** "Analyse génétique et écophysiological de la tolérance à la sécheresse chez le blé tendre". Thèse CIFRE Arvalis-Biogemma-INRA, Université d'Auvergne, travaux en cours.
- Yu J., Pressoir G., Briggs WH., Vroh Bi. I., Yamasaki M., Doebley JF., McMullen MD., Gaut BS., Nielsen DM., Holland JB., Kresovich S., Buckler ES.** 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38:203-208.

CRACQ (Clone the RAC875 QTL) : Clonage et caractérisation d'un gène de maintien du rendement en conditions de stress thermique et hydrique chez le blé

Mickaël THROUDE^{1*}, Delphine FLEURY², Penny TRICKER², Diane MATHER², Scott BODEN², Hervé DUBORJAL¹, Lauriane CHASSAING¹, Matthieu BOGARD³, Katia BEAUCHENE³

1 - Limagrain Europe - Centre de Recherche de Chappes 63720 Chappes, France
2 - School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide- PMB1 Glen Osmond SA 5064, Australia

3 - Arvalis-Institut du Végétal - 45 Voie Romaine 41240 Ouzouer-le-marché, France
*Coordinateur : Mickaël THROUDE, mickael.throude@limagrain.com

Le projet CRACQ répond à l'urgence de l'agriculture européenne face à la diminution des rendements céréaliers due notamment aux changements climatiques. Il visait à introduire des allèles de blé australien résistants au stress hydrique et thermique (issus de la lignée de printemps tolérante RAC875) pour stabiliser les rendements européens. Cette étude s'est focalisée sur le QTL qDHY.3BL mis en évidence par l'Université d'Adélaïde (Thomelin et al. 2021) et notamment le gène candidat TraesCS3B02G572900, annoté comme étant une E3 ubiquitine-proteinase (UBP) codant pour un régulateur négatif appartenant au complexe ubiquitine-protéasome et qui pourrait avoir un effet positif sur la biomasse et le développement des grains lorsqu'il est sous-exprimé chez la lignée RAC875. Les travaux ont été subdivisés en quatre volets complémentaires, visant à valider l'effet de l'allèle positif du gène UBP et de faciliter l'utilisation du QTL qDHY.3BL en sélection, notamment dans les blés d'hiver utilisés en Europe. Le premier s'est focalisé sur l'étude de la variabilité allélique naturelle, au locus du QTL qDHY.3BL, dans des lignées de blé d'hiver et de printemps, par séquençage d'Exome. Le second a permis de développer du matériel végétal en vue de la validation fonctionnelle du gène candidat UBP via l'utilisation de la variabilité induite, présente dans des populations de mutants TILLING. Le troisième volet a consisté à caractériser phénotypiquement la variabilité naturelle du gène UBP et d'en décoder les mécanismes physiologiques dans un vaste réseau d'essai (France, US, Espagne, Australie, Mexique). Enfin, le dernier volet a permis de mettre en évidence le pattern d'expression de la protéine UBP par séquençage d'ARNm de lignées sous stress thermique et hydrique, cultivées en conditions contrôlées.



1- Etude de la variabilité allélique naturelle, dans des lignées de blé d'hiver et de printemps, par séquençage d'Exome

Le gène UBP 3B et ses copies homologues sur les chromosomes 3A et 3D ont été séquencés par séquence capture sur un panel de 528 lignées de blé d'hiver, et par séquençage d'Exome sur un panel de 250 lignées de blé Limagrain.

Dans le gène candidat UBP 3B, nous avons identifié 42 variants, dont 30 dans le gène et 12 dans la région promotrice de 2 kb en 5' du gène. Une annotation fonctionnelle des 30 variants de la région génique a permis d'identifier : 6 variants 3' UTR, 3 variants 5' UTR, un variant intronique, 18 variants synonymes et 2 variants non synonymes (p.Ala297Pro en position 803628975 et p.Val296Ala en position 803628977) situés tous deux dans l'exon 2 du gène.

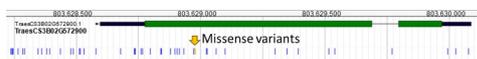


Figure 1 : représentation graphique des 30 variants identifiés dans le gène UBP (TraesCS3B01G572900). SNP synonymes en bleu, SNP non synonymes (missense) en jaune

L'analyse des variants de la zone, n'a mis en évidence aucun polymorphisme entre le parent tolérant à la sécheresse RAC875 versus les parents sensibles Absalon et Altigo. Le polymorphisme SNP ADW595 a cependant été retrouvé entre RAC875 et Kukri, identifié par l'UA. Le SNP ADW595 positionné dans la région promotrice du gène (A to T variant at position chr3B :803634611 bp) a été proposé comme pouvant être le polymorphisme causal du gène candidat UBP par l'université d'Adélaïde (UA). Une analyse GWAS n'a mis en évidence aucun effet de cette zone et variants identifiés dans un panel de blés européens phénotypés en conditions de stress hydrique et thermique (données BreedWheat / 26 essais / 3 années).

En parallèle, l'UA a réalisé une analyse par génotypage du SNP ADW595 sur un panel de 627 lignées de blés de printemps, représentant la variabilité mondiale. Ce travail a permis de mettre également en évidence une fréquence élevée de l'allèle RAC875 en Australie et en Europe

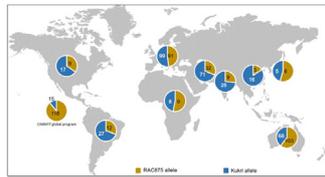


Figure 2 : Distribution de l'allèle UBP RAC875 sur un panel de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Allèle RAC875 en jaune et allèle Kukri en bleu.

3- Caractérisation phénotypique du gène UBP et des mécanismes physiologiques dans un vaste réseau d'essai (blés d'hiver et de printemps)

Un réseau expérimental de 30 essais mis en place entre 2019 et 2022 en France, Espagne, Etats-Unis et Australie sur 13 lieux ; en champ et sur la plateforme conditions contrôlées DroughtSpotter. Sur chaque lieu, nous avons mesuré les composantes classiques de rendement, réalisé un bilan hydrique et une mesure des variables météo afin de caractériser le type de stress rencontré.

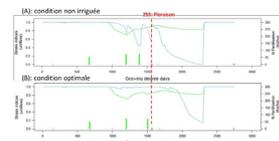


Figure 3 : Exemple de calcul d'indice de stress hydrique sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021. (A) en condition stressée non irriguée et (B) en condition optimale irriguée. Indice de stress (sans unité) en bleu, indice de nutrition azotée (kg/ha) et apports en vert. Le stade floraison est matérialisé par la ligne rouge. L'axe des abscisses est exprimé en degrés jours.

Les résultats au champ, obtenus sur les lignées isogéniques fond hiver, RAC875 x ALTIGO et ABSALON semblent vouloir démontrer que l'effet du QTL qDHY.3BL n'est pas significatif dans le fond génétique des blés d'hiver européens et les environnements testés dans cette étude.

Les 3 couples de lignées isogéniques de type HIF et les deux lignées parentales ARC875 et KUKRI, développés par l'UA ont été évalués sur 17 lieux en Australie et en Espagne entre 2019 et 2022 dans des environnements soumis à un stress hydriques et thermique.

Ce projet est un bel exemple de collaboration internationale qui a permis d'approfondir notre compréhension du locus QTL qDHY.3BL étudié initialement dans les blés de printemps australiens et d'évaluer son potentiel pour l'amélioration de la tolérance au stress hydrique et thermique des blés d'hiver européens, répondant à un défi majeur pour l'agriculture future. Les analyses ont révélé une fréquence élevée des allèles favorables dans le matériel génétique européen, bien que leur effet soit modéré voire négatif dans ces blés, contrairement aux blés de printemps où un effet positif a pu être confirmé. La validation fonctionnelle du gène candidat, par l'utilisation de plantes mutées, n'a pas été possible dans ce projet, mais des perspectives de recherche supplémentaires pourront être envisagées pour éclaircir les mécanismes physiologiques impliqués dans la tolérance au stress, à partir du matériel généré. D'un point de vue méthodologique, ce projet a fourni des approches et des dispositifs expérimentaux utiles pour étudier d'autres QTL d'intérêt agronomique, tout en facilitant le développement de lignées isogéniques et de marqueurs moléculaires pour les futurs programmes de sélection variétale. Enfin, une publication basée sur les résultats de ce projet a été réalisée dans le Journal of Experimental Botany en 2021 (Thomelin et al. 2021).



2- Développement de matériel végétal en vue de la validation fonctionnelle du gène candidat UBP (TraesCS3B02G572900) et ses copies homologues

Quatre populations de TILLING ont été exploitées pour identifier des mutations sur les copies 3A/3B/3D du gène UBP dans des fonds génétiques printemps (GLADIUS et CADENZA) et hiver (APACHE et KALAHARI).

Aucune mutation STOP n'a pu être détectée dans la population CADENZA, nous avons seulement identifié des mutations non-synonymes de moindre intérêt pour la validation fonctionnelle de ce gène. Dans les populations APACHE et KALAHARI, malgré des efforts conséquents de screening par séquençage et de validation des mutations par la méthode KASPAR, nous n'avons identifié que trois mutations STOP sur la copie homologue UBP_3A (TraesCS3A01G505400) et une mutation du site d'épissage de l'intron du gène candidat UBP_3B, décrites dans le tableau ci-dessous.

Population	Mutant ID	Gène	chrom.	Impact	mutation type
Apache	APB_3843	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_302	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_177	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_196	TraesCS3B01G572900	3B	HIGH	splice_intron_variant

Tableau 1 : liste des mutants TILLING type hiver identifiés

Pour toutes ces mutations, nous avons sélectionné et multiplié des plantes homozygotes mutantes et sauvages (de type lignées isogéniques).

Dans la population GLADIUS, l'UA a fixé et multiplié des plantes portant les deux mutations STOP identifiées en amont de ce projet dans le gène UBP_3B (TraesCS3B01G572900). Il n'a pas été possible d'obtenir des doubles et triples mutants fertiles en croisant ces mutants avec d'autres mutants STOP sur les copies 3A et 3D (TraesCS3A01G505400 et TraesCS3D01G512700).



Sur les 10 essais réalisés en Espagne, nous avons observé des variations de l'effet de l'allèle RAC875 sur le rendement (tableau 2). En condition stressée, nous avons mesuré des variations de rendement positives et négatives pouvant aller par exemple de +3.8 à -3.1 q. ha pour le couple NIL 2164, mais il a été observé des pertes de rendement en condition optimale.

Condition	Stress (DRY)					Optimal (IRR)				
	2020	2021	2022	2022	2022	2020	2021	2022	2022	2022
Année	2020	2021	2022	2022	2022	2020	2021	2022	2022	2022
Lieu	CAR	CAS	IRR	CAR	IRR	COR	IRR	COR	IRR	IRR
Couple NIL	Effet rendement moyen en q. ha allèle RAC875 - allèle KUKRI									
Parents	3.6	2.9	7.0	3.1	6.4	6.7	11.7	0.9	0.3	15.4
2164	-3.1	-0.8	2.8	1.5	2.4	3.1	-0.4	-0.7	-0.4	3.1
87	0.4	0.3	4.9	1.5	1.5	-0.9	1.5	3.8	1.9	1.0
1814	0.3	0.6	-1.3	-3.1	3.5	-0.6	3.2	4.5	1.1	0.6

Tableau 2 : Rendement moyen (q/ha) des lignées RAC875 x KUKRI sur les 10 essais espagnols en condition stressée (DRY) et non stressée (IRR). Différence de rendement entre l'allèle A (RAC875) et l'allèle B (KUKRI), positifs en vert, négatif en rouge et non significatifs en bleu.

Nous avons donc pu mettre en évidence un effet du QTL, mais il semble variable entre les couples et les environnements testés, ce qui semble vouloir démontrer un manque de stabilité du QTL dans les environnements stressés.

4- Analyse d'expression de la protéine UBP par séquençage d'ARNm en conditions de stress thermique et hydrique

L'analyse de l'expression du gène UBP_3B, a démontré une variation d'expression assez faible entre les allèles RAC875 et KUKRI : Log2Fold Change de 0,63 et pval de 0.03. Nous avons observé une légère sous expression du gène UBP portant l'allèle RAC875 (en bleu), avec un différentiel non significatif entre les conditions de stress (D et WW) appliquées lors de cette expérience (cf. figure 4).

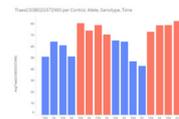


Figure 4 : Expression du gène UBP dans les différentes conditions de stress testées pour les couples 1314 A-B et 2164 A-B. RAC875(A), en rouge et KUKRI(B), en bleu.