

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 céréalières 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 ubiquitin-protein ligase (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.

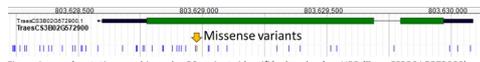


Figure 1 : représentation graphique des 30 variants identifiés dans le gène UBP (TraesCS3B01G572900), SNP synonymes en bleu, SNP non synonymes (missense) en jaune.

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.

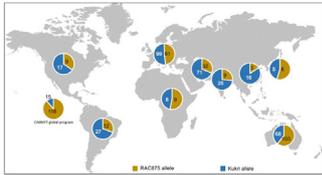


Figure 2 : Distribution de l'allèle UBP RAC875 sur un panel de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Allèle RAC875 en jaune et allèle Kukri en bleu.

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, États-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.

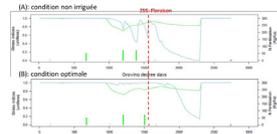


Figure 3 : Exemple de calcul d'indice de stress hydrique sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021. (A) en condition stressée non irriguée et (B) en condition optimale irriguée. Indice de stress (sans unité) en bleu, indice de nutrition azotée (kg/ha) et apports en vert. Le stade floraison est matérialisé 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 KASP&R, 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 (DR)					Optimal (IRR)				
	2020	2021	2021	2022	2022	2020	2021	2021	2022	2022
Année	CA8	CA8	IR8	CA8	IR8	CA8	CA8	CA8	CA8	CA8
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
2164	-3.1	-0.4	3.9	1.5	2.4	1.1	-0.4	-0.7	-0.4	-3.3
87	0.4	0.5	4.9	1.5	3.5	0.6	1.5	1.8	1.3	1.0
1334	1.3	0.5	-1.2	-1.1	1.5	-0.6	2.2	4.5	3.5	0.6

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

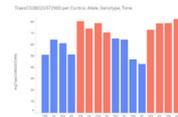


Figure 4 : Expression du gène UBP dans les différentes conditions de stress testées pour les couples 1314 A-B et 2164 A-B. RAC875(A), en rouge et KUKRI(B), en bleu.

