



Analyse génétique et écophysiologique de l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

Matthieu Bogard

► To cite this version:

Matthieu Bogard. Analyse génétique et écophysiologique de l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22100 . tel-00679581

HAL Id: tel-00679581

<https://theses.hal.science/tel-00679581>

Submitted on 16 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° D.U. : 2100

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : génétique et physiologie végétale

Soutenue le 11/01/2011 par

Matthieu BOGARD

Analyse génétique et écophysiologique de l'écart à la
relation teneur en protéines - rendement en grains chez
le blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

Composition du jury

Saïd Mouzeyar	Professeur à l'UBP	Président du jury
Brigitte Courtois	Chercheur au CIRAD	Rapporteur
Judith Burstin	Directrice de recherche INRA	Examinatrice
Bertrand Hirel	Directeur de recherche INRA	Rapporteur
Vincent Allard	Chargé de recherche INRA	Encadrant
Jacques Le Gouis	Directeur de recherche INRA	Encadrant

UMR 1095 INRA / UBP GDEC
"Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales"
234, Avenue du Brézet, F-63 000 Clermont-Ferrand, France

Table des matières

I	Introduction générale	13
1	Contexte de l'étude	15
2	Botanique et génomique des blés	17
2.1	Anatomie et classification du genre <i>Triticum</i>	17
2.2	Evolution du genre <i>Triticum</i>	20
3	Brève histoire de la culture des blés	23
3.1	Aspects historiques et archéo-botaniques	23
3.2	La production et les utilisations du blé tendre	24
3.3	Les enjeux autour de la fertilisation azotée	26
II	Problématique de recherche	29
4	Rendement en grains et teneur en protéines	31
4.1	Intérêts portés au rendement en grains et à la teneur en protéines du blé tendre	31
4.2	Déterminismes génétiques et écophysiologiques du rendement en grains et de la teneur en protéines : des caractères complexes et intégratifs	32
4.2.1	La période végétative : mise en place des capacités de stockage et d'assimilation de l'azote et du carbone	32
4.2.2	La floraison : une période critique du développement	34
4.2.3	Le remplissage du grain : accumulation d'amidon et des protéines de réserve	37
4.3	Difficultés rencontrées pour l'étude des déterminants du rendement en grains et de la teneur en protéines	40
5	Interconnexions entre métabolismes carbonés et azotés	41
5.1	Absorption de l'azote chez le blé	41
5.2	Assimilation de l'azote chez le blé	43
5.3	Remobilisation de l'azote et sénescence monocarpique chez le blé	45
6	La relation négative teneur en protéines - rendement en grains chez le blé	47
6.1	Déterminisme de la relation négative teneur en protéines - rendement en grains	48
6.1.1	Compétition pour l'énergie	48
6.1.2	Variabilité génétique pour la durée de sénescence des feuilles après floraison	48
6.1.3	Incompatibilité génétique	49

6.2	Facteurs de variation de la relation négative teneur en protéines - rendement en grains	49
6.3	Les perspectives d'amélioration du rendement en grains et de la teneur en protéines	51
7	L'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains ou GPD	53
7.1	Hypothèses sur les bases biologiques du GPD	54
7.1.1	La remobilisation de l'azote vers les grains en cours de remplissage . .	54
7.1.2	L'absorption d'azote durant la période post-floraison	55
III	Objectifs et stratégie de recherche	57
8	Le projet "NUE traits"	59
9	Questions de recherche développées au cours de la thèse	61
9.1	Le GPD est-il déterminé par la remobilisation ou l'absorption d'azote post-floraison ?	61
9.2	Le GPD est-il associé à un profil de sénescence ?	61
9.3	Quelles régions chromosomiques permettent d'augmenter la teneur en protéines indépendamment du rendement en grains ?	63
IV	Étude des bases écophysologiques du GPD	65
10	Deviation from the grain protein concentration - grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat.	69
10.1	Abstract	70
10.2	Introduction	70
10.3	Materials and methods	72
10.3.1	Trials	72
10.3.2	Plant sampling and measurements	75
10.3.3	Statistical analysis	75
10.4	Results	75
10.4.1	The negative grain protein concentration - grain yield relationship and grain protein deviation across environments and genotypes	75
10.4.2	Post-anthesis N uptake and N remobilization	78
10.4.3	Correlations between grain protein deviation and N nutrition related processes	78
10.5	Discussion	80
10.5.1	Post-anthesis N uptake is the main process accounting for grain protein deviation	80
10.5.2	Physiological traits potentially involved in determining post-anthesis N uptake	82
10.5.3	Implications for breeding and crop management	83
10.6	Conclusion	84
10.6.1	Acknowledgements	84

V Étude du déterminisme génétique des relations entre sénescence des feuilles après floraison, teneur en protéines et rendement en grains 87

11 Studies of the relationship between leaf senescence during grain filling, grain yield, grain protein concentration and flowering time in a wheat mapping population.	91
11.1 Abstract	92
11.2 Introduction	92
11.3 Materials and methods	94
11.3.1 Plant material, growing conditions and plant sampling	94
11.3.2 Determination of dry mass and nitrogen concentrations	96
11.3.3 Visual scoring of leaf and canopy senescence	96
11.3.4 Genotyping	97
11.3.5 Genetic mapping	98
11.3.6 QTL detection	99
11.3.7 Analysis of QTL co-location	99
11.4 Results	99
11.4.1 Genetic and environment effects	99
11.4.2 Phenotypic correlations between major agronomic traits and leaf senescence during grain filling	104
11.4.3 QTL detection for AD, GY, GPC, AGN ₉₂ , and leaf senescence during grain filling	106
11.4.4 Stable QTL for AD, GY, GPC, AGN ₉₂ and leaf senescence during grain filling	108
11.4.5 Pleiotropic QTL affecting leaf senescence during grain filling and GY or GPC : locations and analysis of their allelic effects	110
11.5 Discussion	115
11.5.1 QTL detection and analysis of QTL co-locations	115
11.5.2 Leaf senescence during grain filling is mainly driven by the timing of flowering in wheat populations segregating for major genes determining flowering time	117
11.5.3 Physiological process underlying the relationship between leaf senescence during grain filling and GPC or GY in wheat	118
11.5.4 Implications for breeding improved wheat cultivars	119
11.5.5 Acknowledgements	119

VI Identification de régions chromosomiques permettant d'augmenter la teneur en protéines indépendamment du rendement en grains chez le blé 121

12 Using connected populations to identify genomic regions to improve grain protein concentration independently of grain yield in winter wheat	125
12.1 Abstract	126
12.2 Introduction	126
12.3 Materials and methods	128
12.3.1 Plant material and Field experiments	128
12.3.2 Phenotyping	130

12.3.3	Genotyping	130
12.3.4	Genetic mapping	131
12.3.5	QTL detection	131
12.3.6	Analysis of QTL co-location	131
12.3.7	Statistics	131
12.4	Results and discussion	132
12.4.1	Phenotypic variation	132
12.4.2	Genetic map	134
12.4.3	QTL detection for AD, GY, GPC and GPD	135
12.4.4	Allelic effects of the genomic regions determining GPC independently of GY or contributing to the GPC-GY relationship	144
12.5	Conclusion	145
12.5.1	Acknowledgements	146
VII	Synthèse des résultats et perspectives	147
13	L'absorption d'azote post-floraison est un déterminant majeur du GPD	151
13.1	Perspectives d'étude des mécanismes de régulation de l'absorption d'azote post-floraison par le statut azoté	152
13.2	Perspectives d'étude de la variabilité génétique pour l'architecture et le fonc- tionnement racinaire	153
14	Certaines régions chromosomiques sont susceptibles d'augmenter la teneur en protéines sans diminuer le rendement en grains	155
15	Vers une intégration des études génétiques et physiologiques	157
VIII	addendum	159
IX	Contributions scientifiques	163
16	Publications réalisées au cours de cette thèse	165
17	Autres publications	167
18	Contributions lors de conférences internationales	169
18.1	Communications sous forme de poster	169
18.2	Communications sous forme de présentations orales	169

Table des figures

2.1	Relations phylogénétiques entre les principaux groupes d'espèces monocotylédones.	17
2.2	Échelle de Zadock décrivant le cycle de développement du blé.	18
2.3	Anatomie de l'épi, des fleurs et du grain de blé.	19
2.4	Relations phylogénétiques entre les blés cultivés et leurs ancêtres sauvages. .	20
2.5	Organisation du génome du blé hexaploïde.	21
3.1	Top 10 des productions agricole à l'échelle mondiale.	25
3.2	Top 10 des pays producteurs de blé au niveau mondial.	25
3.3	Évolution des prix du blé tendre en France pour la période 1966-2010.	26
3.4	Évolution de la consommation de fertilisants azotés à l'échelle mondiale et à l'échelle de la France de 1960 à 2002.	27
4.1	Régulation et interactions moléculaires des gènes de réponse à la vernalisation et à la photopériode.	36
4.2	Évolution de la masse sèche, de la masse fraîche et du contenu en eau du grain de blé au cours de son remplissage.	38
5.1	Interactions entre les processus liés au métabolisme du carbone et ceux liés au métabolisme de l'azote à l'échelle de la plante.	42
5.2	Absorption et assimilation de l'azote chez le blé.	44
6.1	Évolution du rendement en grains et de la teneur en protéines des blés récoltés en France de 1986 à 2008.	47
6.2	Effets des facteurs agro-climatiques sur la relation teneur en protéines-rendement en grains.	51
7.1	L'écart à la relation teneur en protéines-rendement en grains ou GPD.	53
9.1	Plan de croisement de type demi-diallèle pour l'obtention de trois populations de lignées haploïdes-doublées.	64
9.2	Processus physiologiques susceptibles d'affecter l'absorption d'azote post-floraison et <i>in fine</i> le GPD chez le blé.	67
10.1	Relationship between grain yield and grain protein concentration.	76
10.2	Linear regression between mean post-anthesis N uptake and mean total N at anthesis.	80
10.3	Linear regression between grain protein deviation and the residuals of the post-anthesis N uptake - total N at anthesis relationship.	81

11.1	Definitions of the parameters used to fit the observed senescence scores during the post-anthesis period and examples of fits using mean values across potential N or low N treatments for each of the two parents of the Toisonдор × CF9107 wheat mapping population.	98
11.2	Linear regression between mean onset of the senescence phase and grain yield or grain protein concentration.	102
11.3	Putative pleiotropic QTL found on the 2A chromosome for the Toisonдор × CF9107 mapping population determining anthesis date, grain protein concentration, total above ground N at harvest and traits related to leaf senescence during grain filling.	111
11.4	Putative pleiotropic QTL found on the 2D chromosome for the Toisonдор × CF9107 mapping population determining anthesis date, grain protein concentration, grain yield, total above ground N at harvest and traits related to leaf senescence during grain filling.	112
11.5	Putative pleiotropic QTL found on the 7D chromosome for the Toisonдор × CF9107 mapping population determining anthesis date, grain protein concentration, grain yield and traits related to leaf senescence during grain filling.	113
11.6	Additive effects of the CF9107 allele at the closest marker to the putative pleiotropic QTL detected on chromosome 7D for grain protein concentration and grain yield calculated for each environment.	115
12.1	The negative grain protein concentration - grain yield relationship calculated for each of the three mapping populations used in this study.	134
12.2	Comparison of the effects of the CF9107 or Quebon allele at the QTL found for GPC and GPD on the three mapping populations used in this study.	138
12.3	Confidence intervals of the QTL found on the 2A chromosome.	140
12.4	Confidence intervals of the QTL found on the 3B chromosome.	141
12.5	Confidence intervals of the QTL found on the 7D chromosome.	142
12.6	Additive effects of the CF9107 or Quebon allele at the closest marker to the putative pleiotropic QTL for grain protein concentration and grain yield on chromosome 2A2 and 7D calculated for each population × environment combinations.	143

Liste des tableaux

10.1	Summary of environments characteristics.	73
10.2	Mean grain yield, grain protein concentration, grain protein deviation, grain N deviation, ratio of grain N deviation on total grain N, post-anthesis N uptake, N remobilization and N remobilisation efficiency of the 27 wheat genotypes. .	74
10.3	Mean grain yield, mean grain protein concentration, slope and coefficient of determination of the grain protein concentration - grain yield relationship, post-anthesis N uptake, N remobilization and N remobilization efficiency for the 27 environments.	77
10.4	Correlation coefficients calculated between grain protein deviation and N remobilization, post-anthesis N uptake or N remobilization efficiency	79
10.5	Correlations between grain protein deviation, post-anthesis N uptake, total N at anthesis and anthesis date	85
11.1	Characteristics of the environments studied.	95
11.2	Intercepts, slopes, correlation coefficients and p-values for the grain protein concentration-grain yield relationship for the Toisonдор $\times$ CF9107 mapping population in the different environments studied.	100
11.3	Descriptive statistics on anthesis date, grain yield, grain protein concentration and traits related to leaf senescence during grain filling for the Toisonдор $\times$ CF9107 mapping population.	101
11.4	Analyses of variance based on the three control cultivars for anthesis date, grain yield, grain protein concentration and traits related to leaf senescence during grain filling.	103
11.5	Correlation coefficients for grain protein concentration and grain yield <i>versus</i> anthesis date and traits related to leaf senescence during grain filling among 140 doubled haploid lines of the Toisonдор $\times$ CF9107 wheat mapping population.	105
11.6	Summary of the results of QTL analyses using the Toisonдор $\times$ CF9107 wheat mapping population.	107
11.7	Summary of putative stable QTL identified using the Toisonдор $\times$ CF9107 wheat mapping population.	109
11.8	Summary of putative pleiotropic QTL determining anthesis date, grain protein concentration, grain yield, total above ground N at harvest and traits related to leaf senescence during grain filling identified using the Toisonдор $\times$ CF9107 mapping population.	114
12.1	Characteristics of the environments studied.	129
12.2	Descriptive statistics on grain yield, grain protein concentration and anthesis date for the three mapping populations used in this study.	133

12.3	Intercepts, slopes, correlation coefficients and p-values of the grain protein concentration-grain yield relationship for the three mapping populations in the different environments studied.	136
12.4	Summary of the results of QTL analyses using the three connected wheat mapping population grown in seven environments for anthesis date, grain protein concentration, grain protein deviation and grain yield.	137

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Gilles Charmet, directeur de recherche et directeur administratif de l'UMR 1095 INRA/UBP "Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales", de m'avoir accueilli au sein de cette unité. Je tiens également à remercier Brigitte Courtois, chercheur au CIRAD, Bertrand Hirel, directeur de recherche INRA et Judith Burstin, directrice de recherche INRA d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce manuscrit.

Mes plus chaleureux remerciements vont à mes maîtres Jacques Le Gouis, directeur de recherche INRA, Vincent Allard et Pierre Martre, chargés de recherche INRA, qui m'ont guidé au cours de cette thèse. Sans leur encadrement scientifique, leur patience (il en aura fallu!) et leur soutien, je suis bien conscient que ce travail de recherche n'aurait pas pu être finalisé à temps.

Je remercie également les étudiants que j'ai encadrés au cours de leur stage : Charlène Pourpe, pour un stage de BTS en 2009 et Matthieu Jourdan pour un stage de master II la même année. Ils ont contribué significativement aux travaux effectués et m'ont permis d'avoir un aperçu de ce que constitue l'encadrement d'étudiants.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont, à un moment ou à un autre, apporté leurs contributions aux travaux effectués durant cette thèse : Jacqueline Philippon, Séverine Rougeol, Marie Reine Perretant, Catherine Grand-Ravel, Joëlle Mes-saoud, Nicole Allard, Bernard Bonnemoy et Jean-Louis Joseph.

Enfin, je remercie le lecteur de ce manuscrit de bien vouloir porter attention à ces travaux de recherche.

Première partie

Introduction générale

Chapitre 1

Contexte de l'étude

Chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), comme chez d'autres céréales, il existe une relation négative entre la teneur en protéines et le rendement en grains qui pose des problèmes aux sélectionneurs car elle constitue un obstacle pour l'amélioration simultanée de ces deux caractères essentiels à l'utilisation des blés. Une stratégie agronomique permettant de limiter cette relation négative consiste à effectuer un apport d'azote tardif autour de l'épiaison mais la valorisation de cet azote apporté tardivement au cours du cycle de culture dépend largement des conditions pédo-climatiques qui doivent être favorables à l'absorption et l'assimilation de cet élément. Plus généralement, les contraintes économiques et environnementales qui pèsent sur l'utilisation des fertilisants azotés plaident pour une diminution des apports de fertilisants avec notamment la mise en place de systèmes de culture dits "faible intrants" et l'utilisation en amélioration des plantes de la variabilité génétique existante afin d'augmenter le rendement en grains et la teneur en protéines sans nécessairement utiliser davantage les fertilisants azotés.

A ce titre, il a été proposé d'utiliser l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains afin d'identifier des géotypes présentant une teneur en protéines supérieure à celle prédite par la relation teneur en protéines - rendement en grains. Cet écart, ou GPD ("Grain Protein Deviation"), est déjà utilisé pour l'évaluation des variétés de blé en cours d'inscription au catalogue officiel Français, mais ses bases génétiques et écophysiologiques restent mal connues.

Le GPD offre une opportunité nouvelle d'étudier la variabilité génétique pour des caractères physiologiques affectant différenciellement le rendement en grains et la teneur en protéines. En effet, les performances variétales pour ces deux variables agronomiques dépendent de nombreux facteurs génétiques, environnementaux et d'interactions génotype $\times$ environnement. De plus, les interconnexions entre métabolismes carbonés et azotés du niveau moléculaire à l'échelle de la plante entière rendent difficiles les études ayant pour but de révéler les bases génétiques et écophysiologiques de ces caractères et l'utilisation des résultats de ces études en amélioration variétale restent limitée.

Après une brève introduction d'ordre générale sur le blé, son histoire évolutive et sa culture, la problématique de recherche sera développée, mettant en exergue les interactions entre métabolismes carbonés et azotés à l'origine de la relation négative teneur en protéines - rendement en grains chez le blé et les différentes hypothèses quant au déterminisme du GPD, notamment quant à l'impact potentiel de la remobilisation et de l'absorption d'azote durant la période post-floraison. Par la suite, les objectifs et la stratégie de recherche appliquée au cours de cette étude seront décrits en préambule des trois articles rédigés afin de valoriser les résultats obtenus au cours de cette thèse.

Chapitre 2

Botanique et génomique des blés

2.1 Anatomie et classification du genre *Triticum*

Le genre *Triticum* appartient à la tribu des Triticées au sein de la famille des Poacées et plus largement au groupe des angiospermes monocotylédones (Figure 2.1 p.17).

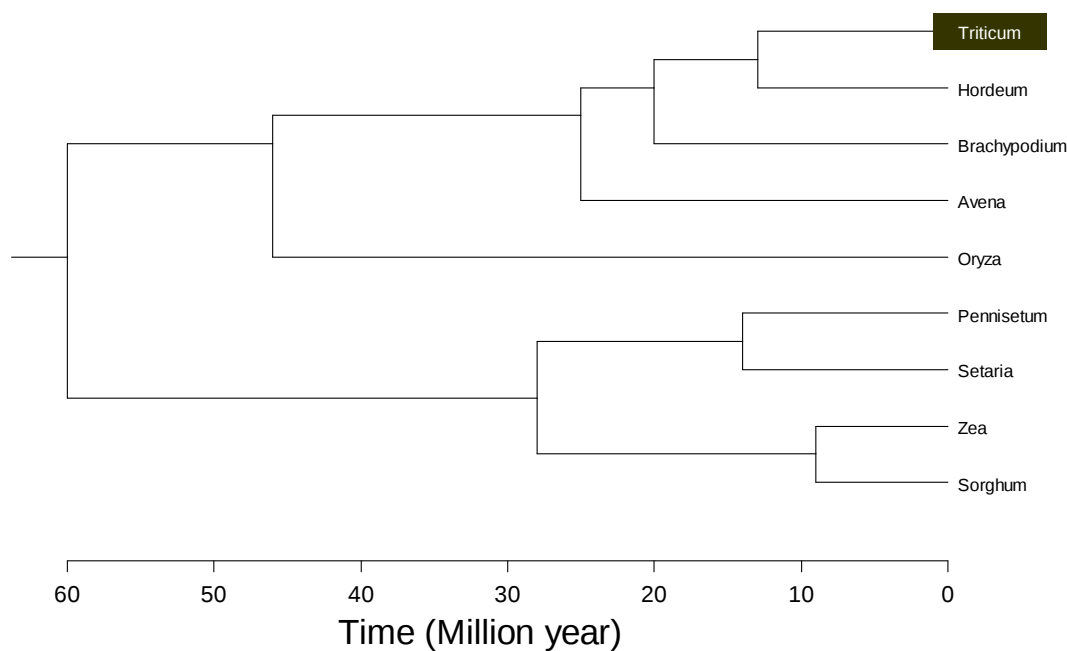


FIGURE 2.1 – Relations phylogénétiques entre les principaux groupes d'espèces monocotylédones. Les dates de divergence de chaque phylum sont en millions d'années. Le blé tendre appartient au genre *Triticum* dont les genres les plus proches sont *Hordeum* et *Brachypodium*. Les principaux genres cultivés les plus proches sont le riz (*Oryza*), le sorgho (*Sorghum*) et le maïs (*Zea*). D'après Bolot et al. (2009).

Les espèces cultivées les plus proches des Triticées sont le maïs (*Zea mays*), le sorgho (*Sorghum bicolor*) et le riz (*Oryza* sp.). Les blés sont couramment regroupés parmi les céréales,

un groupe polyphylétique comprenant des Poacés (blé, orge, avoine, maïs...) mais aussi une Polygonacée (le sarrasin), une Chénopodiacée (le quinoa) et une Pédaliacée (le sésame). Les espèces du genre *Triticum* sont des herbacées annuelles à feuilles alternes et à croissance définie. De graine à graine, le cycle du blé se compose d'une période végétative marquée par la production de racines, feuilles et tiges puis d'une phase reproductrice marquée par la formation des épis, des fleurs puis par le remplissage des grains. L'observation du cycle de développement du blé a conduit à l'identification de stades clés du développement décrits et normalisés par différents auteurs selon des échelles de développement (échelle de Zadock ; Figure 2.2 p.18, échelle de Feek, échelle du BBCH¹).

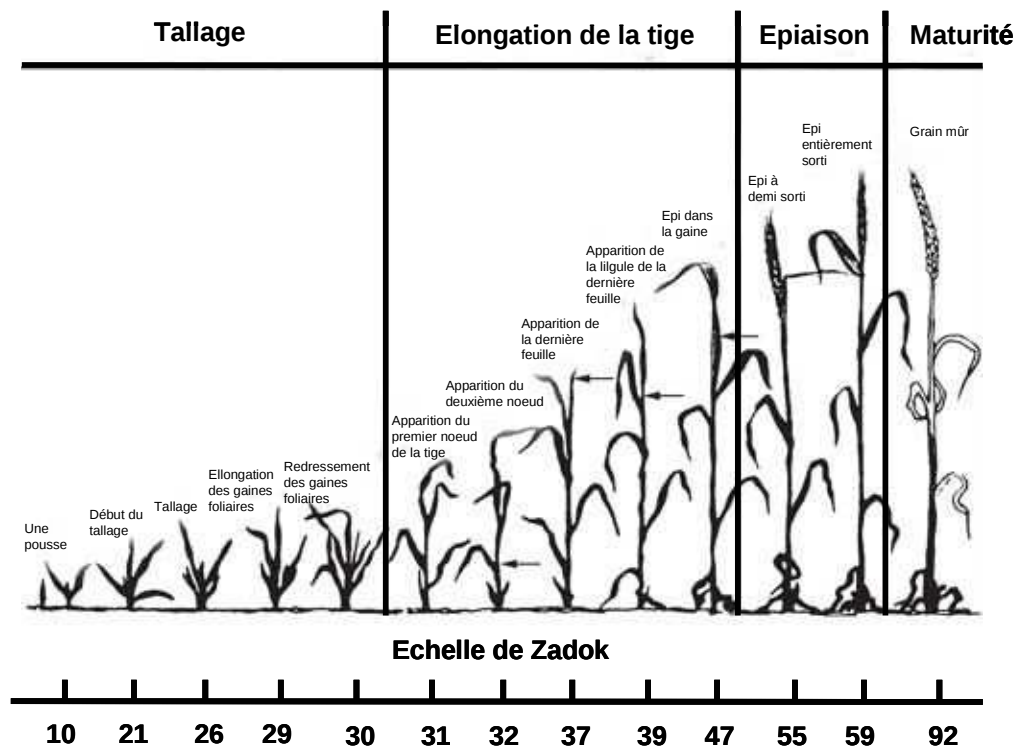


FIGURE 2.2 – Échelle de Zadock décrivant le cycle de développement du blé (Zadoks et al., 1974). Chaque étape clé du développement est désignée par un nombre allant de 10 à 92.

L'appareil végétatif est constitué de différentes talles émises depuis le plateau de tallage à la base de la plante. Ces talles résultent du développement du bourgeon principal (talle principale) et des bourgeons axillaires (talles secondaires). Chaque talle se compose de différents phytomères comprenant tige, gaine, limbe foliaire, un bourgeon axillaire et porte à son sommet un épi formé de deux rangées d'épillets situés de part et d'autre du rachis. Un épillet regroupe plusieurs fleurs (généralement trois à quatre) à l'intérieur de deux glumes. Chaque fleur est dépourvue de pétales et est entourée de deux glumelles (pièces écailleuses non colorées). Elle contient trois étamines et un ovaire surmonté de deux styles plumeux (Figure 2.3 p.19).

La fleur du blé est dite cléistogame, c'est-à-dire que, le plus souvent, le pollen est relâché avant que les étamines ne sortent de la fleur. Du fait du caractère cléistogame de la fleur, l'autofécondation est le mode de reproduction le plus fréquent (autogamie). Les glumes et les

1. Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry

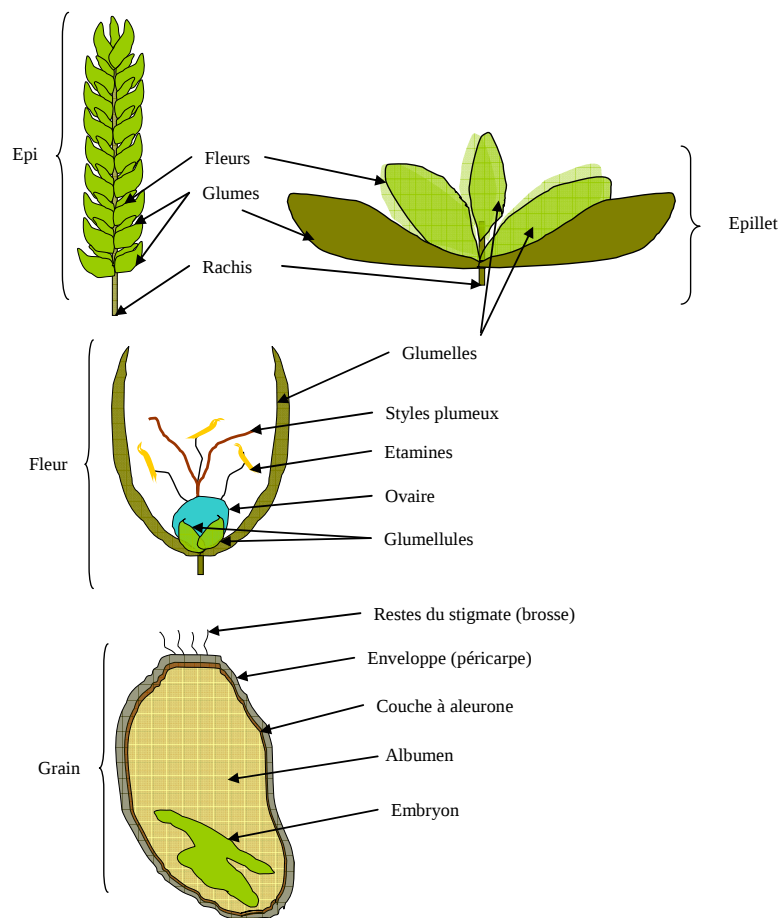


FIGURE 2.3 – Anatomie de l'épi, des fleurs et du grain de blé. L'épi est formé de deux rangées d'épillets situés de part et d'autre du rachis. Un épillet regroupe généralement trois fleurs à l'intérieur de deux glumes. Chaque fleur est entourée de deux glumelles et contient deux pièces stériles, les glumellules, trois étamines et un ovaire surmonté de deux styles plumeux. Le grain, ou caryopse, est constitué d'une enveloppe, de tissus nourriciers (albumen, couche à aleurone) et renferme un embryon.

glumelles sont éliminées au moment du battage pour libérer le grain. Le grain, ou caryopse, est à la fois le fruit et la graine du fait que les enveloppes du fruit sont soudées à celle de la graine. Ses réserves sont contenues dans l'albumen composé majoritairement d'amidon ($\approx 65\%$), de protéines ($\approx 15\%$), d'eau ($\approx 15\%$) et de divers micro éléments (Fe, Zn, acides gras, vitamines...). La structure et la composition de l'amidon et des protéines conditionnent les propriétés physico-chimiques de la pâte obtenue après ajout d'eau à la farine.

2.2 Evolution du genre *Triticum*

Le genre *Triticum* regroupe de nombreuses espèces présentant une large gamme de diversité morphologique et agroécologique. Notamment, ce genre regroupe des espèces de ploïdies variées : des espèces diploïdes telles que l'Engrain (*Triticum monococcum*), des espèces tétraploïdes avec l'Amidonier (*Triticum dicoccum*) ou le blé dur (*Triticum durum*) et enfin des espèces hexaploïdes telles que le blé tendre (*Triticum aestivum*). Il apparaît que la polyploïdisation a joué un rôle majeur dans l'évolution de la famille des Poacées (Salse et al., 2008; Bolot et al., 2009) et plus largement dans celle des Angiospermes (Soltis, 2005). La nature polyploïde du génome des blés aurait également contribué au succès de leur domestication (Dubcovsky and Dvorak, 2007).

Concernant les Triticées, deux événements majeurs d'allopolyploïdisation ont conduit à la série d'espèces de ploïdies variées constituant ce genre (Figure 2.4 p.20). Le premier

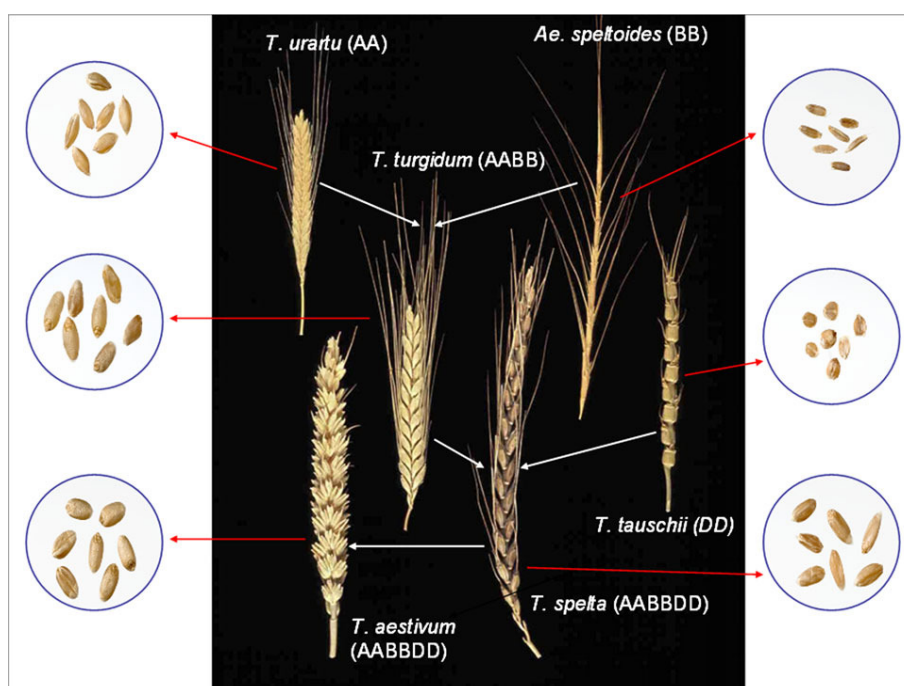


FIGURE 2.4 – Relations phylogénétiques entre les blés cultivés et leurs ancêtres sauvages. Le blé tendre résulte de deux hybridations inter-spécifiques successives. Le croisement entre *Triticum urartu* et une espèce proche d'*Aegilops speltoides* a donné *Triticum turgidum*, lequel a conduit à la naissance de *Triticum turgidum* ssp *durum*, le blé dur. Le croisement entre *Triticum turgidum* et *Triticum tauschii* a conduit à la formation du blé tendre, *Triticum aestivum*. Ce dernier présente un génome hexaploïde constitué de la somme des trois génomes diploïdes des espèces ancêtres (AA, BB, DD). D'après Shewry (2009).

événement de polyploïdisation a résulté du croisement entre deux espèces diploïdes ($2n = 14$) *Triticum urartu* (génome A) et une espèce proche d'*Aegilops speltoides* (génome B) disparue aujourd'hui. Ce croisement a eu lieu avant la domestication par voie de sélection naturelle il y a environ 0.5 million d'années. Les descendants sont les blés tétraploïdes comme le blé dur

(*Triticum turgidum* ssp *durum*) et l'amidonnier (*Triticum dicoccum*). Un second croisement entre une variété domestiquée d'un blé tétraploïde et *Triticum tauschii* porteur du génome D a conduit, il y a environ 10 000 ans, à l'obtention de blés hexaploïdes tels que le blé tendre (*Triticum aestivum*) ou l'épautre (*Triticum spelta*).

Cette allopolyploïdisation a conduit à la formation de génomes de très grande taille. Le génome du blé tendre est structuré en 21 paires de chromosomes regroupées en sept groupes homéologues représentant les génomes de chaque ancêtre (Figure 2.5 p.21).

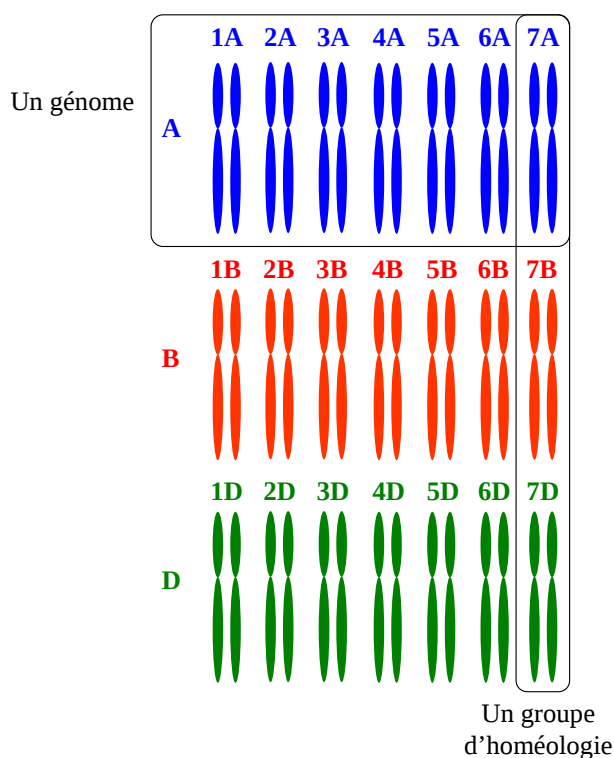


FIGURE 2.5 – Organisation du génome du blé hexaploïde. Ce génome comprend 21 chromosomes intégrant les trois génomes homéologues (A, B, D) des espèces ayant successivement formé la série d'allopolyploïdes du genre *Triticum*. L'ensemble formé par trois chromosomes homéologues se nomme “groupe d'homéologie”.

Du fait de l'apparement des espèces constituant le génome du blé tendre, les gènes homéologues ont des fonctions proches mais ont pu, éventuellement au cours de l'évolution, diverger suffisamment pour acquérir des fonctions biologiques propres. Le gène *PH1* (“Pairing homeologous 1”), présent sur le bras long du chromosome 5B, supprime les appariements homéologues à la méiose, ce qui a pour conséquence un comportement diploïde strict à la méiose (Griffiths et al., 2006). Le génome du blé tendre est constitué de 17 milliards de paires de base (cinq fois le génome humain) dont plus de 80% de séquences répétées. La taille ainsi que la forte proportion de séquences répétées constituent des obstacles importants pour le séquençage du génome du blé (Paux et al., 2008).

Chapitre 3

Brève histoire de la culture des blés

3.1 Aspects historiques et archéo-botaniques

La domestication des blés constitue un jalon dans l'Histoire des sociétés humaines marquant le début de l'ère Néolithique qui se traduira par l'adoption d'une économie de production fondée sur l'agriculture et l'élevage. C'est vers -10 000 ans av. J-C que les blés ont été domestiqués avec pour centre d'origine la région du “croissant fertile” entre le Tigre et l'Euphrate (Shewry, 2009). Les données archéologiques fournissent des preuves tangibles de la synchronie entre les débuts de la culture des blés et l'organisation de sociétés sédentaires, marquant ainsi la fin de la période nomade au cours de laquelle chasse et cueillette constituent les principaux moyens de subsistance (Diamond, 2002). Selon Kislev (1984), l'histoire de la culture des blés peut être découpée en trois phases majeures : la révolution agro-technique, la révolution de la domestication et l'expansion de l'agriculture.

La révolution agro-technique s'est déroulée alors que les sociétés humaines étaient encore dépendantes de la chasse et de la cueillette, jusqu'au 11^{ème} millénaire avant JC. Elle est attestée par de nombreuses traces archéologiques de la culture des blés telles que celles exhumées sur le site de Tell Abu Hureyra (Nord de la Syrie) : lames de faucilles parfois encore montées sur des manches en os, grains de différentes céréales, récipients en terre cuite pour le stockage des grains, meules en pierre. L'invention et l'utilisation de la faucille pour récolter les blés constituent une composante majeure de cette période permettant de réduire les efforts et d'améliorer la productivité.

La seconde phase est marquée par le processus de domestication ou “syndrome de domestication” qui a largement été étudié. Ce processus consiste en une modification radicale du matériel végétal ou animal d'origine sauvage en un matériel adapté aux conditions d'élevage et aux utilisations qui en découlent (Diamond, 2002). Chez le blé, la fixation au sein de l'espèce de plusieurs gènes dits de domestication traduit la pression de sélection appliquée inconsciemment par les premiers agriculteurs. La fixation d'allèles propres à la domestication des gènes Tg (“Tenacious glumes” ou “glumes adhérentes”), Br (“Brittle rachis” ou “rachis cassant”) et q (“q gene”, “free-threshing” ou “grain libre au battage”) illustre ce mécanisme évolutif (Zohary and Hopf, 1988).

Une explication originale avancée pour la fixation du caractère “épis non cassant” (gène Br) dans les populations de blé repose sur l'application inconsciente de pression de sélection par les femmes du néolithique (Kislev, 1984). A cette époque, un mélange d'épis entiers, d'épillets ou de grains était récolté puis conservé pour la consommation et en tant que semences pour l'année suivante. Il est envisagé que la préparation de la farine par les femmes du néolithique était réalisée en utilisant de préférence les grains et épillets déjà détachés

de l'épi, réduisant ainsi leurs efforts. Il en résulte que les épis aux rachis les moins fragiles étaient conservés pour les semis de l'année suivante.

La troisième phase de l'histoire de la culture des blés est la phase d'expansion. La culture des blés s'est propagée vers l'Europe et l'Asie simultanément au fil des migrations et des échanges commerciaux (Balfourier et al., 2007). Elle apparaît en Grèce, à Chypre et en Inde dès 6 500 av. J-C, en Egypte vers 6 000 av. J-C, atteint l'Allemagne et l'Espagne vers 5 000 av. J-C, l'Angleterre et la Scandinavie vers 3 000 av. J-C et enfin la Chine vers 2 000 av. J-C. La culture du blé sur le continent américain n'est apparue qu'après l'arrivée de Christophe Colomb au cours du XVII^e siècle.

De nos jours, les principales espèces cultivées du genre *Triticum* sont *Triticum aestivum* L. (blé tendre) et *Triticum durum* (blé dur). Elles diffèrent principalement par l'aspect et la composition du grain ainsi que par leur aire de répartition agroécologique, le blé dur étant cultivé en zones méditerranéennes tandis que le blé tendre est cultivé en zones plus tempérées. Au cours de sa "migration", des avancées technologiques ont permis de faire progresser les techniques culturales, de récolte et de conservation des blés : l'utilisation de la traction animale (dès 3 000 av. J-C), la rotation des cultures, l'utilisation de la fumure organique, du fléau pour le battage des grains (dès le moyen-âge), l'apparition de semoir au XVIII^e siècle et enfin, l'application de fertilisants azotés minéraux, l'arrivée des moissonneuses batteuses et des variétés semi-naines de la "révolution verte" au cours du XIX^e siècle ont permis d'accroître fortement la productivité des cultures de blé.

3.2 La production et les utilisations du blé tendre

Le blé tendre représente 95% des blés cultivés au niveau mondial (Shewry, 2009). Le blé est la 3^{ème} production agricole mondiale et la 2^{ème} production céréalière après le maïs et avant le riz (Figure 3.1 p.25). Les principaux pays producteurs sont la Chine, l'Inde, les Etats-Unis d'Amérique, la Russie, la France et le Canada (Figure 3.2 p.25).

Dans le contexte d'une économie mondialisée, les échanges de blé se font à l'échelle planétaire et le blé est l'espèce pour laquelle les échanges commerciaux sont les plus importants. Les principaux pays exportateurs sont les Etats-Unis d'Amérique, l'Union Européenne des 27, le Canada et l'Australie. La variation des rendements moyens par pays traduit l'existence de potentiels climatiques et de systèmes agricoles différents (intensif en Europe, extensif en Australie et en Amérique du Nord). Malgré des rendements relativement faibles, des pays comme l'Australie sont susceptibles d'avoir un impact majeur sur les prix mondiaux du fait de leurs importantes superficies cultivées en blé. Une des conséquences de cette structure des échanges est la volatilité des prix (Figure 3.3 p.26). Pour prendre l'exemple de l'année 2010, la spéculation sur la baisse des stocks, due notamment à la forte sécheresse, aux incendies en Russie et au moratoire sur les exportations de ce pays, a élevé les prix à des niveaux rarement atteints (cours rendu Rouen 210 €/t⁻¹ en Août 2010 soit une progression de 70% par rapport à Août 2009 ; source Agreste Conjoncture Septembre 2010¹).

Sur le plan alimentaire, on estime que le blé constitue environ 20% des calories consommées et constitue la 1^{ère} source de protéines (Zohary and Hopf, 1988). Les produits issus de la culture des blés (grains et pailles) sont majoritairement utilisés à des fins alimentaires même si quelques utilisations non alimentaires existent. De manière générale, les grains sont utilisés tels quels pour l'alimentation du bétail ou pour produire de la farine servant à la production de pain, de pâtes ou de biscuits. L'amidon peut également être purifié et utilisé

1. <http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/conjoncture/panoramas/article/panorama-de-septembre-2010>

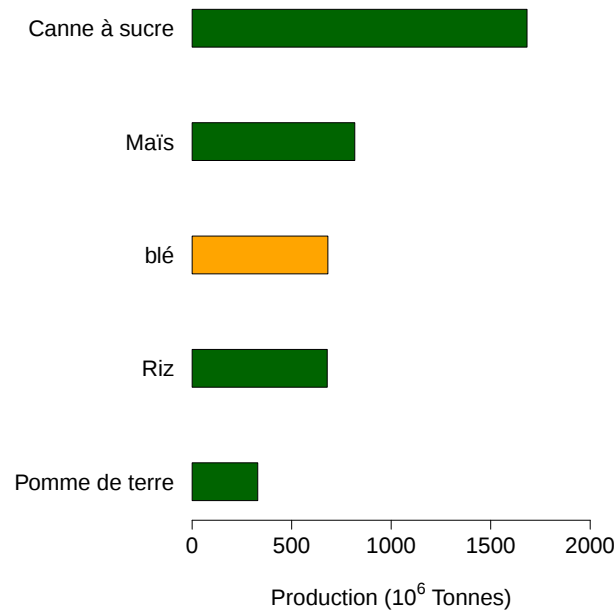


FIGURE 3.1 – Top 10 des productions agricole à l’échelle mondiale. Le blé (“wheat” en anglais) est la troisième production agricole mondiale et la deuxième production céréalière après le maïs. Le blé tendre représente 90% de la production mondiale de blé. Source : FAOstat, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

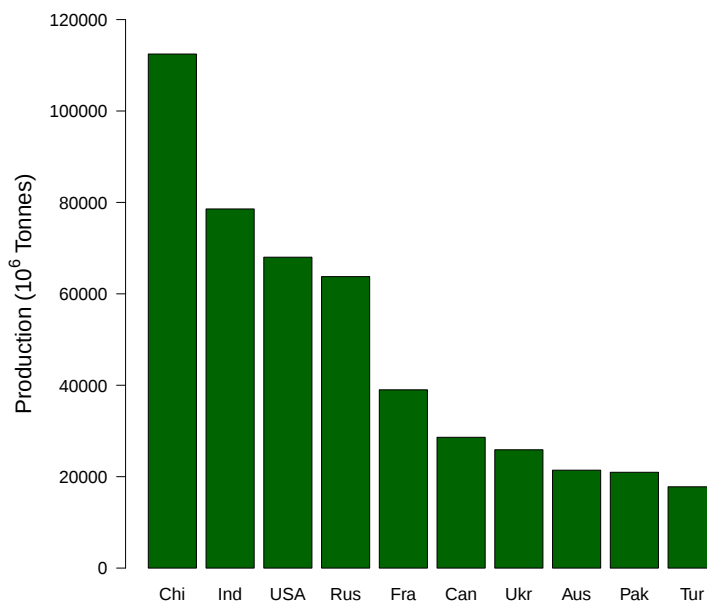


FIGURE 3.2 – Top 10 des pays producteurs de blé au niveau mondial. Les principaux pays producteurs sont la Chine, l’Inde, les USA, la Russie, la France et le Canada. Source : FAOstat, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

dans de nombreux domaines (cosmétique, papèterie, production de bioéthanol et de matériaux plastiques biodégradables) bien que, dans ce cas, la pomme de terre soit la plante la plus utilisée. Les pailles sont valorisées dans la confection de toiture en chaume, utilisées

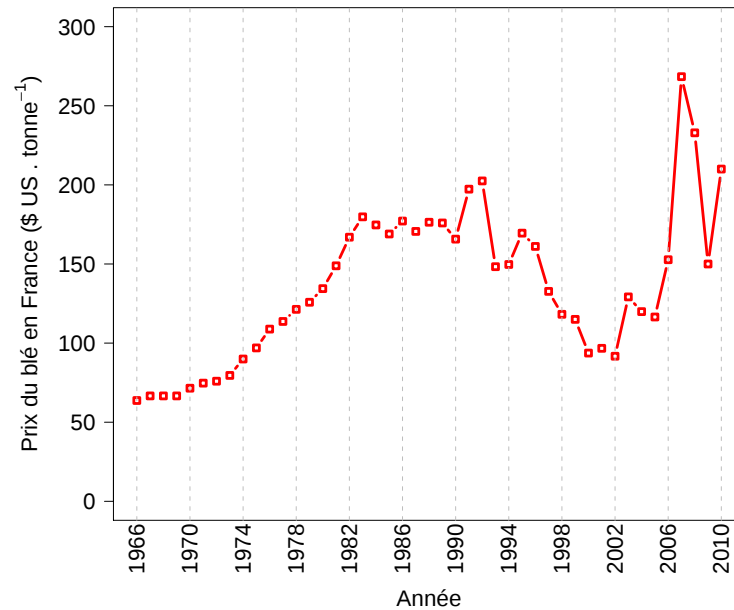


FIGURE 3.3 – Évolution des prix du blé tendre en France pour la période 1966-2010. Après une diminution relativement constante des prix au cours des années 1990, ceux-ci ont augmenté très significativement durant la première décennie du XXI^e siècle, du fait notamment de l'augmentation de la demande, des prix du pétrole, de la production de biocarburant et de la spéculation sur les matières premières agricoles. Source : FAOstat, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

comme litière ou comme aliment pour le bétail. Le grain de blé est également utilisé pour la production d'éthanol destiné à la filière bio-fuels (Poitrat, 1999). Cette filière s'intéresse également à la valorisation d'autres sous-produits de la production de blé tels que les pailles (Nigam, 2001) ou les fibres du grain (Palmarola-Adrados et al., 2005).

3.3 Les enjeux autour de la fertilisation azotée

C'est au début du XX^e siècle que la chimie de synthèse a permis la production d'engrais azoté à grande échelle. Auparavant, la fertilisation azotée reposait sur l'apport d'engrais organiques (lisier, guano) et naturellement sur les dépôts d'azote atmosphérique. En 1908, Fritz Haber combina l'azote gazeux (N_2) et l'hydrogène (H^+) pour synthétiser de l'ammoniac (NH_3) et, en 1914, Karl Bosh construisit la première usine de production à grande échelle qui permit de diminuer considérablement les prix. Ainsi, au niveau mondial, l'apport de fertilisants azotés est passé de 3-4 millions de tonnes vers 1950 à environ 80 millions de tonnes par an à la fin des années 1980 (Frink et al., 1999) (Figure 3.4 p.27).

Les ingrédients utilisés dans la fabrication d'engrais azotés (N_2 , H^+) sont disponibles en grandes quantités mais les besoins élevés en énergie pour la synthèse de ces engrais font que les prix des engrais azotés sont largement dépendants des cours du pétrole. En conséquence, la diminution des ressources en énergies fossiles et l'accroissement de leur prix vont inévitablement impacter les prix des engrais azotés. A ce titre, l'accroissement continu de l'application de fertilisants azotés observée au cours du XX^e siècle s'est inversé pour la première fois en 1973 à la suite du premier choc pétrolier (Frink et al., 1999) (Figure 3.4 p.27).

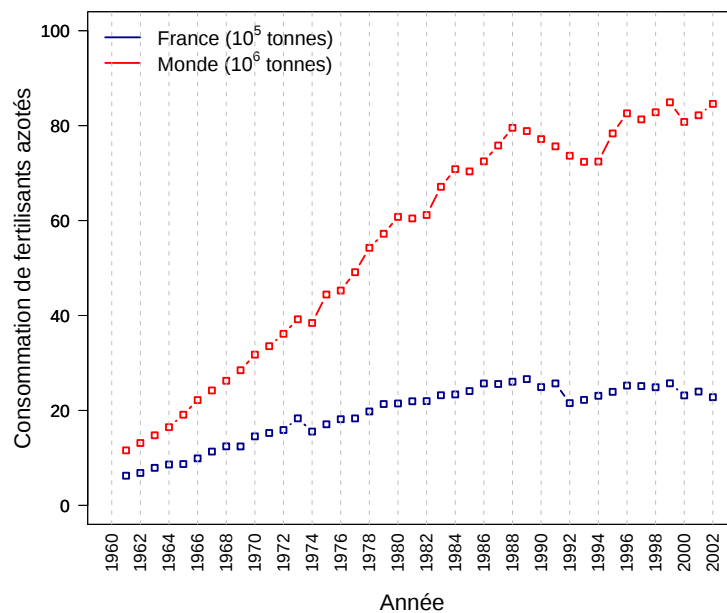


FIGURE 3.4 – Évolution de la consommation de fertilisants azotés à l’échelle mondiale et à l’échelle de la France de 1960 à 2002. L’augmentation de la consommation de fertilisants azotés s’est ralentie en France à partir du début des années 1990 du fait de l’augmentation des prix des fertilisants mais aussi de l’apparition de nouvelles réglementations (directive EU “nitrates”). Source : FAOstat, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

L’utilisation des fertilisants azotés de synthèse a permis une augmentation importante des rendements (Hirel et al., 2007). Néanmoins, l’apport excessif d’azote peut induire une plus forte sensibilité à la verse et aux maladies (Spiertz and De Vos, 1983; Crook and Ennos, 1995) et avoir des effets néfastes sur les écosystèmes. L’eutrophisation des rivières et des écosystèmes marins, du fait du lessivage de l’azote vers les eaux fluviales, en sont des conséquences connues (Tilman, 1999; Giles, 2005; Beman et al., 2005). La directive européenne du 12 décembre 1991 (dite “directive nitrates”) impose la lutte contre la pollution des eaux par les nitrates d’origine agricole (source DIREN²). D’autre part, la dénitrification bactérienne conduit à la formation de protoxyde d’azote (N_2O), un gaz à effet de serre (GES) qui participe à environ 6% du pouvoir radiatif total des GES à l’échelle mondiale et qui est en constante augmentation (Parry et al., 2007). A l’échelle française, les émissions de GES induites par l’activité agricole sont de l’ordre de 20% des émissions totales et, au sein de ces émissions d’origines agricoles, le N_2O en représente 56% (Seguin et al., 2002).

Dans ce contexte économique et environnemental, il apparaît nécessaire de permettre une production durable de céréales dans un contexte de diminution de l’utilisation d’intrants azotés. Une telle démarche a bien sûr une importante composante agronomique. La mise au point de pratiques agricoles économes en azote est un enjeu majeur de recherche que cela soit à une échelle parcellaire (pratique de semis et travail du sol à effets positifs sur la matière organique du sol) ou du système de culture (rotations longues incluant des légumineuses par exemple). Néanmoins, la filière agricole étant soumise à de multiples contraintes socio-économiques, la mise en place de telles pratiques ne peut être généralisée sans incitation

2. Directions Régionales de l’Environnement

politique forte. Le second levier permettant l'émergence d'une production céréalière économe en azote est le progrès génétique. Il s'agit donc, pour la recherche opérant en amont de la sélection variétale, d'identifier des caractères et les gènes associés permettant de maintenir les rendements et la qualité des blés dans des conditions d'apports en azote réduits.

Deuxième partie

Problématique de recherche

Chapitre 4

Rendement en grains et teneur en protéines

Le rendement en grains d'une culture de blé (généralement exprimé en t ha^{-1} à 0% d'humidité) et la teneur en protéines des grains (g de protéines / g de matière sèche ; %) sont les produits de différentes composantes mises en place tout au long du cycle de culture, durant la période végétative puis durant celle du remplissage du grain. Ces deux variables résultent de l'intégration de processus en rapport à la fois avec les métabolismes du carbone et de l'azote. Le rapport C/N du grain étant largement en faveur du carbone, le rendement en grains dépend en premier lieu des facteurs déterminant l'assimilation photosynthétique, le stockage et la remobilisation des hydrates de carbone. Quant à elle, la teneur en protéines dépend fortement de la quantité d'azote absorbée et remobilisée vers le grain mais, du fait que son calcul intègre le rendement en grains, cette variable traduit mal ces deux processus. En effet, à teneurs en protéines égales, des génotypes présentant des rendements différents sont aussi des génotypes présentant des quantités d'azote absorbées et/ou remobilisées très différentes. A ce titre, le rendement en protéines (produit de la teneur en protéines et du rendement en grains, exprimé en kg de protéines par hectare) reflète mieux les performances des génotypes en termes d'absorption et d'allocation de l'azote vers les grains.

4.1 Intérêts portés au rendement en grains et à la teneur en protéines du blé tendre

Le rendement en grains est la cible principale des programmes d'amélioration variétale toutes céréales confondues. Différentes études ont pointé une stagnation des rendements du blé depuis la fin des années 1990 en France et plus largement en Europe (Brisson et al., 2010), aux USA (Graybosch and Peterson, 2010) et en Asie (Kalra et al., 2008). Brisson et al. (2010) mettent en avant des raisons liées aux changements climatiques mais aussi à la diminution de l'application de fertilisants azotés et à une modification des rotations culturales favorisant le Colza (*Brassica napus*) au détriment des Fabacées (précédent cultural fixateur symbiotique d'azote). Ces auteurs écartent l'idée selon laquelle le progrès génétique, estimé à $0.1 \text{ t ha}^{-1}\text{an}^{-1}$ sur la période 1980-2010, aurait atteint son niveau maximal, ce qui avait été envisagé par ailleurs (Calderini and Slafer, 1998). Cette stagnation des rendements, alors que les terres arables disponibles au niveau mondial sont en régression et la population en augmentation constante (estimée à 10 milliards d'êtres humains en 2050 selon la FAO), est une source de préoccupations pour les gouvernements qui dès lors encouragent les recherches

qui promettent un nouveau “grand pas en avant” comme celui réalisé dans les années 1960 avec l’introduction des gènes de nanismes et de tolérance aux maladies qui ont permis la “révolution verte” en Asie du Sud-Est et en Amérique Latine (Fedoroff et al., 2010).

Bien que le rendement en grains reste la cible principale des programmes d’amélioration variétale des blés, la teneur en protéines est également une cible d’intérêt. En effet, une teneur élevée en protéines est recherchée en panification, bien que la relation entre l’aptitude à la panification et la teneur en protéines dépende du génotype considéré du fait de l’existence d’une variabilité génétique pour la synthèse des protéines du grain sur le plan qualitatif. Le type de protéines et le ratio des différentes fractions sur la quantité de protéines totale sont ainsi des facteurs importants pour la prédiction de la valeur d’utilisation des blés (Branlard et al., 2001; Oury et al., 2010). Une teneur élevée en protéines est également recherchée pour les blés destinés à l’alimentation animale où elle constitue une composante importante de sa valeur nutritionnelle. Ceci est renforcé dans un contexte de prix bas pour lequel le blé devient plus compétitif que les produits de substitution aux céréales (Oury et al., 2003). D’autre part, des pénalités commerciales sont appliquées à l’exportation aux lots de blé présentant une teneur en protéines inférieure à 11%. Or, pour certains pays comme la France, le principal débouché des blés étant l’exportation pour l’alimentation humaine, la stabilité de la teneur en protéines est un impératif majeur.

D’un point de vue agronomique, les performances génotypiques pour ces deux caractères dépendent potentiellement de nombreux facteurs tout au long du cycle de la plante ; ces facteurs étant à la fois génétiques, environnementaux ou le produit de leur interaction.

4.2 Déterminismes génétiques et écophysiologiques du rendement en grains et de la teneur en protéines : des caractères complexes et intégratifs

L’objectif de cette partie n’est pas de rapporter de manière exhaustive l’ensemble des déterminants génétiques et environnementaux du rendement en grains et de la teneur en protéines mais plutôt de donner un aperçu de la complexité du système sol × plante × atmosphère qui intègre l’ensemble de ces déterminants tout au long du cycle du blé et conditionne les performances génotypiques.

4.2.1 La période végétative : mise en place des capacités de stockage et d’assimilation de l’azote et du carbone

Au cours de la période végétative, qui s’étale du semis à floraison, l’architecture de la plante de blé se met en place au niveau aérien (émission de phytomères successifs) et souterrain (croissance et développement du système racinaire). Cette phase du développement impacte fortement les performances en termes de rendement en grains et de teneur en protéines. En effet, c’est au cours de cette phase que sont mises en place les capacités de stockage et d’assimilation de l’azote et du carbone. Ces éléments sont stockés dans les différents organes soit sous formes minérales (NO_3^-) soit sous formes organiques (WSC¹, amidon, Rubisco). A ce titre, l’enzyme Rubisco peut-être considérée, du fait de son abondance, comme une forme de stockage de l’azote dans le compartiment foliaire (Lawlor, 2002). Ce stockage transitoire permet de mettre à disposition des ressources lors de la formation de nouveaux organes dont

1. WSC : Water Soluble Carbohydrates

les grains. En plus des facteurs génétiques, des facteurs biotiques (compétition pour les nutriments, maladies) et abiotiques (température, disponibilité en eau, lumière et nutriments) modulent la croissance et le développement au cours de la période végétative.

La réussite de l'établissement d'un couvert de blé d'hiver dépend, dès le semis, de la vitesse d'émergence des plantules, de la longueur du coléoptile² et de la résistance au froid. La variabilité génétique pour l'établissement des plantules et le développement ultérieur de la surface foliaire est associée à une meilleure compétitivité vis-à-vis des adventices (O'Donovan et al., 2005) et à une diminution des pertes en eau dues à l'évapotranspiration (Richards et al., 2002). Des études ont montré l'existence de variabilité génétique pour la longueur et le diamètre du coléoptile chez le blé. Des régions chromosomiques associées à des QTL pour ces différents paramètres ont été identifiées, pointant notamment l'impact des gènes *RHT* ("reduced height") d'insensibilité aux gibbérellines (Rebetzke et al., 2007). De même, des régions chromosomiques associées à des QTL pour la vitesse d'émergence des plantules ont été identifiées (Spielmeyer et al., 2007; Landjeva et al., 2010). Enfin, des QTL de résistance au froid ont été identifiés et suggèrent des interconnexions entre vernalisation et acclimatation au froid (Galiba et al., 2009).

Les capacités d'acquisition et d'assimilation de l'azote et du carbone sont largement déterminées par l'établissement de la surface foliaire. En effet, c'est de cette surface dont dépendent les capacités d'interception des rayonnements actifs pour la photosynthèse (PAR; "Photosynthetically Active Radiations"). Or, la production de biomasse est largement dépendante du PAR intercepté par le couvert végétal (Monteith and Moss, 1977). Des facteurs génétiques et environnementaux affectent la mise en place de la surface foliaire. Parmi les facteurs génétiques, les gènes *RHT* affectent la vitesse d'expansion des feuilles (Appleford and Lenton, 1991). Un apport d'azote augmente la surface foliaire, la concentration en chlorophylle, en Rubisco et la durée de vie des feuilles (Gastal and Nelson, 1994; Triboï and Ntonga, 1993; Yang and Zhang, 2006; Kichey et al., 2007). Un stress hydrique induit une diminution de la surface foliaire (Tardieu et al., 2000) ainsi que les dégâts liés aux insectes ravageurs et aux maladies (Haile et al., 1999; Robert et al., 2005).

Le nombre de talles émises durant la période végétative, qui conditionne le nombre d'épis par mètre carré, est sous l'influence conjointe de facteurs environnementaux (azote, compaction du sol...), de caractéristiques de structure du couvert (densité de semis) et de facteurs génétiques, en particulier du gène *TIN* localisé sur le bras court du chromosome 1A (Spielmeyer and Richards, 2004). Le blé présente une bonne plasticité pour le nombre de talles émises vis-à-vis de la disponibilité en azote (Oscarson, 2000). Ce mécanisme d'adaptation consiste en une surproduction de talles. Si les ressources sont insuffisantes, les talles surnuméraires avortent avant floraison et leur nutriments sont remobilisés vers les autres organes (Power and Alessi, 1978; Lauer and Simmons, 1989; Del Moral and Del Moral, 1995). La variabilité génétique associée à cette plasticité est pour le moment peu étudiée.

Le nombre de grains par mètre carré est établi au cours de la période végétative. Il résulte du produit entre le nombre d'épis par mètre carré et le nombre de grains par épis. Plus particulièrement, les 30 derniers jours avant floraison constituent la période la plus critique où le nombre de grains produits par épis dépend linéairement du quotient photothermique (Fischer, 1985). Le rendement en grains apparaît corrélé positivement au nombre de grains produits. Néanmoins, la relation de causalité fait l'objet de discussion. Pour certains auteurs, c'est de l'établissement à floraison du nombre de grains à remplir dont dépend le rendement en grains (Fischer, 2008) tandis que d'autres considèrent que cette corrélation positive entre rendement et nombre de grains est la conséquence de la capacité à accumuler

2. Gaine protectrice permettant l'émergence du premier phytomère après germination

des ressources en carbone et en azote et reflète donc une plasticité équivalente à celle observée pour le nombre de talles (Sinclair and Jamieson, 2008).

4.2.2 La floraison : une période critique du développement

Cette phase de transition entre la période végétative et la période reproductrice correspond, d'un point de vue agronomique, au stade où 50% des épis d'une parcelle présentent 50% de leurs étamines visibles. Ce stade intervient bien après la transition florale du méristème qui correspond, d'un point de vue physiologique, à la transition d'un méristème apical produisant des feuilles et des tiges vers un méristème reproducteur produisant les pièces florales : cette transition florale a lieu avant le stade où l'épi se situe à 1cm du plateau de tallage.

Le contrôle de la date de floraison est central, tant du point de vue écologique qu'agronomique. Ceci est attesté par les nombreuses études ayant mis en évidence des QTL pour différents caractères agronomiques au niveau des régions impliquées dans le contrôle de la date de floraison (Quarrie et al., 2005; Habash et al., 2007; Laperche et al., 2007). Du nombre de fleurs fertilisées dépend le nombre de grains formés et *in fine* le succès reproductif (Bäurle and Dean, 2006), ou plutôt le rendement en grains chez les plantes cultivées telles que le blé. Les organes floraux sont particulièrement fragiles, notamment au gel (risque de "coulure" des fleurs). Au cours de l'évolution, des systèmes de perception et d'intégration des signaux environnementaux et endogènes sont donc apparus, permettant aux plantes de percevoir les changements saisonniers et ainsi d'optimiser la date de transition du stade végétatif au stade reproducteur. La flexibilité évolutive (diversité allélique) des systèmes de régulation de la date de floraison conditionne largement l'adaptabilité et la distribution géographique d'une espèce (Law and Worland, 1997; Distelfeld et al., 2009; Dubcovsky and Dvorak, 2007).

Chez le blé, comme chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, il existe trois voies de régulation de la date de floraison : la voie photopériodique (gènes *PPD*), la voie de la vernalisation (gènes *VRN*) et la voie autonome (gènes *EPS*, "earliness per se"). Bien que de nombreux gènes soient homologues entre ces deux espèces, des différences significatives ont pu être mises en évidence (Colasanti and Coneva, 2009). Chez le blé et plus largement chez les Triticées, les génotypes peuvent être classés en fonction de leurs besoins en vernalisation et de leur sensibilité à la photopériode. Ainsi, les blés de type hiver, semés en automne, nécessitent une exposition prolongée à des températures basses et présentent généralement une forte induction de la floraison en jours longs. Au contraire, la floraison des blés de type printemps ne nécessite pas d'exposition prolongée au froid et dépend uniquement de leur réponse à la photopériode et de leur précocité intrinsèque.

Les besoins en vernalisation empêchent la transition florale du méristème durant l'hiver, une période défavorable à la floraison. Au niveau moléculaire, les mécanismes de réponse à la vernalisation chez *A. thaliana* ont largement été étudiés (Sung and Amasino, 2005). Les gènes appartenant à cette voie sont des répresseurs de la transition florale eux-mêmes réprimés par une exposition prolongée au froid *via* des mécanismes épigénétiques faisant intervenir des modifications covalentes des histones (méthylation notamment) et une condensation de la chromatine empêchant leur transcription. Malgré des phénotypes analogues au regard des besoins en vernalisation entre *A. thaliana* et le blé, aucun gène orthologue de la voie dite "FLC dépendante" chez *A. thaliana* n'a été identifié chez le blé.

Un modèle dit des "coïncidences externes", décrivant les mécanismes par lesquels la durée du jour (photopériode) est intégrée dans la régulation du développement, a été établi chez *A. thaliana* (Imaizumi and Kay, 2006). Ce modèle fait intervenir l'horloge circadienne qui

induit l'expression, selon un cycle journalier, de différents gènes dont le gène *CONSTANS* (*CO*). Dans ce modèle, la floraison est induite lorsque le niveau d'expression de *CO* coïncide avec une période d'éclairement. Autrement dit, pour une plante de jours longs comme c'est le cas du blé, l'augmentation de la durée du jour au printemps fait coïncider le pic d'expression journalier de ce gène et permet de stabiliser la protéine de *CO* laquelle est sinon dégradée à l'obscurité.

CO est un inducteur du gène *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), l'intégrateur des signaux de la voie de la vernalisation et de ceux de la voie photopériodique chez *A. thaliana*, assurant leur transfert vers le méristème apical. Il a été montré, chez cette plante modèle, que ce gène agit comme un signal longue distance dont l'existence a depuis longtemps été envisagée mais est restée putative, le signal en question ayant été imaginé comme hormonal et nommé "florigène". La protéine de *FT* transite des feuilles vers l'apex où elle induit l'expression des gènes d'identité du méristème assurant la transition florale (Corbesier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007). Un mécanisme similaire a été mis en évidence chez le blé (Li and Dubcovsky, 2008).

Chez le blé, les besoins en vernalisation sont largement dépendant des allèles aux gènes homéologues *VRN1*, *VRN2* et *VRN3*. L'impossibilité de fleurir pour des mutants de délétions de *VRN1*, cartographié sur le groupe homéologue 5 (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*), montre que ce gène est un inducteur essentiel à la transition florale. *VRN2* est un répresseur de la floraison n'ayant pas d'homologue chez *A. thaliana*. Chez le blé, il a été cartographié à la fois sur le groupe homéologue 4 (4B; *VRN-B2*, 4D; *VRN-D2*) et sur le groupe 5 (5A; *VRN-A2*) du fait d'une translocation (Dubcovsky et al., 1998). Une délétion au niveau de ce gène supprime en partie les besoins en vernalisation. Enfin, *VRN3* est un homologue de *FT* et joue le même rôle physiologique (Li and Dubcovsky, 2008). Ce gène a été cartographié sur le groupe 7 et l'homologue du groupe D (*VRN-D3*) a été localisé à proximité du marqueur génétique "barc126" (Bonnin et al., 2008).

En ce qui concerne la réponse à la photopériode, *PPD1* promeut la floraison en induisant *VRN3* en jours longs. Ce sont les variations alléliques au niveau de l'homologue du groupe D (*PPD-D1*), présent sur le bras court du chromosome 2D, qui sont les plus déterminantes. Une délétion de 2kb au niveau du promoteur de ce gène est responsable d'un allèle d'insensibilité à la photopériode conduisant à une floraison précoce en jours courts (Beales et al., 2007). L'insensibilité à la photopériode constitue, pour les blés cultivés sous des latitudes moyennes telles qu'au Sud de l'Europe, un mécanisme d'évitement des stress thermiques et hydriques fréquemment observés en fin de cycle cultural. Dans le cadre de l'amélioration variétale pour ces régions, la manipulation de la date de floraison doit donc se faire indépendamment des gènes de sensibilité à la photopériode, notamment à travers l'utilisation des *loci* impliqués dans la voie autonome. Les gènes appartenant à la voie autonome ne sont pas connus à l'heure actuelle bien que des positions du génome contrôlant cette voie aient été identifiées (Hanocq et al., 2007; Griffiths et al., 2009).

Un modèle intégrant les voies de la vernalisation et de la photopériode et décrivant le contrôle de la transition florale chez le blé a été établi (Distelfeld et al., 2009). Dans ce modèle, *VRN3* est réprimé durant l'hiver par *VRN2*. L'induction de *VRN1* au cours de la vernalisation réprime *VRN2*, ce qui conduit, en conjonction avec l'induction par la voie photopériodique, à l'induction de *VRN3* dont la protéine est exportée vers l'apex et induit la transcription de *VRN1* à un niveau suffisant pour déclencher la transition florale du méristème (Figure 4.1 p.36). Dans ce modèle, il est envisagé une interaction entre la voie photopériodique et celle de la vernalisation à travers l'action répressive de *VRN2* sur *VRN1* en jours courts, bien que des preuves expérimentales restent nécessaires à la validation

de cette composante. D'autres *loci* impliqués dans les voies de la photopériode et de la vernalisation ont été cartographiés mais ne sont pas encore caractérisés (Hanocq et al., 2007; Griffiths et al., 2009).

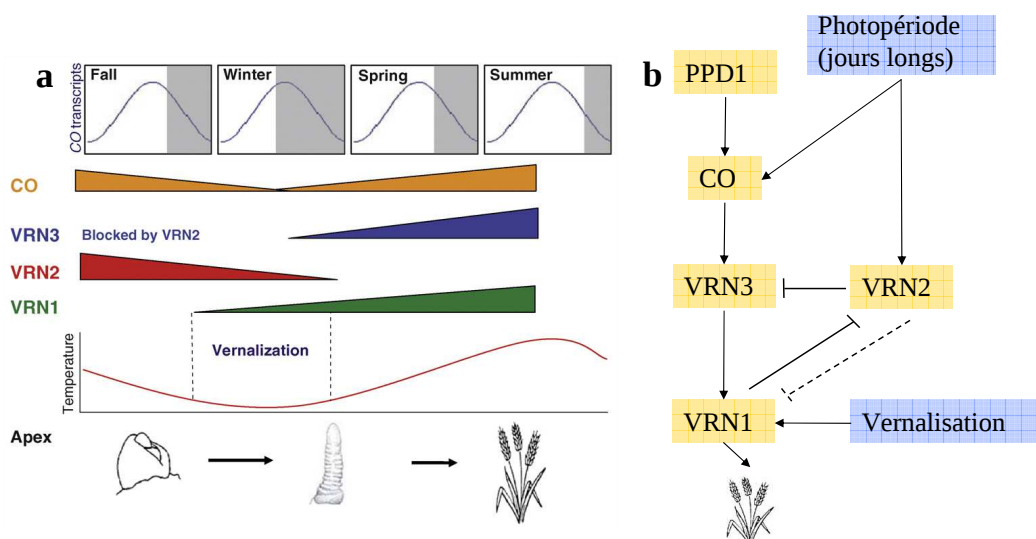


FIGURE 4.1 – Régulation des gènes de réponse à la vernalisation et à la photopériode par les signaux environnementaux au cours du cycle cultural du blé (a) et interactions au niveau moléculaire entre les différents acteurs du système (b). La courbe rouge représente l'évolution des températures. La période hivernale de vernalisation permet l'induction de *VRN1* qui réprime *VRN2*. Les courbes bleues représentent les variations journalières de l'expression du gène *CONSTANS* (*CO*). Selon le modèle des "coïncidences externes", la stabilisation de la protéine *CO* est effective lorsque le pic d'expression de ce gène coïncide avec une période d'éclairement en jours longs. *CO* induit alors l'expression de *VRN3* en jours longs, favorisée par la répression de *VRN2* après vernalisation. Ceci conduit à une forte augmentation de l'expression de *VRN1*, intégrateur des signaux des voies de la vernalisation et de la photopériode, qui induit la transition florale du méristème apical. D'après Distelfeld et al. (2009).

Au-delà de l'importance de la variabilité génétique pour l'adaptation à des conditions agroécologiques variées, l'impact de cette variabilité sur les performances agronomiques est aussi à prendre en compte. En effet, certains facteurs environnementaux ont potentiellement un impact important sur les performances agronomiques des génotypes lorsqu'ils interviennent autour du stade floraison. C'est le cas, par exemple, d'une carence azotée qui, lorsqu'elle intervient à ce stade du développement, réduit significativement le nombre de grains produits à travers une diminution de la production de talles (Demotes-Mainard et al., 1999; Martre et al., 2003). Or, dans le cadre d'études portant sur des populations de blé ségrégeant pour des gènes majeurs contrôlant la date de floraison (*PPD*, *VRN*), la gamme de variation pour la date de floraison est suffisante pour induire des modifications importantes

de l'environnement perçu par des génotypes de précocités différentes, ce qui se traduit par de fortes interactions génotype $\times$ environnement. En effet, la variabilité génétique pour le rythme de développement induit un décalage du cycle entre génotypes précoces et tardifs qui, de fait, confronte ces différents génotypes aux mêmes contraintes environnementales mais à des stades de développement différents. Ceci se traduit, par exemple lorsqu'un apport de fertilisant azoté est réalisé à la même date sur des parcelles de génotypes de précocités différentes, par des interactions génotype $\times$ date d'apport d'azote, influençant en particulier la répartition de l'azote absorbé entre les périodes pré et post-floraison. La prise en compte de ce type d'effet pour les études impliquant des apports de fertilisants azotés peut être réalisée, soit en appliquant les fertilisants à stades physiologiques constants, soit par l'utilisation d'un matériel végétal variant peu pour la date de floraison (Pinto et al., 2010).

4.2.3 Le remplissage du grain : accumulation d'amidon et des protéines de réserve

L'amidon et les protéines de réserve du grain sont accumulés dans l'albumen constitué de la couche à aleurone périphérique et de cellules internes riches en amidon (Dupont and Altenbach, 2003). La cinétique de remplissage du grain est décomposée en différentes phases clés de l'accumulation de matière sèche, d'amidon, de protéines et d'eau (Altenbach et al., 2003) (Figure 4.2 p.38)

La durée de remplissage en matière sèche est de l'ordre de 700-800°C jours. Le remplissage en amidon et en protéines démarre à la fin de la phase de cellularisation de l'albumen (environ 250°C jours après floraison). L'accumulation d'amidon se termine généralement avant l'accumulation de protéines (respectivement autour de 700°C jours et 750-800°C jours). Différents facteurs génétiques et environnementaux sont susceptibles d'affecter la synthèse et l'accumulation dans les grains de l'amidon et des protéines de réserve (Dupont and Altenbach, 2003). De plus, la synthèse et l'accumulation d'amidon ou de protéines dans le grain étant relativement indépendantes (Jenner et al., 1991), ces facteurs sont susceptibles d'affecter différemment chacun de ces processus. En effet, la synthèse d'amidon dépend largement de la photosynthèse pendant le remplissage du grain tandis que l'accumulation d'azote dans le grain provient majoritairement de l'azote assimilé et stocké durant la phase végétative et est moins dépendante de la durée de remplissage des grains (limitation par les sources). En termes de cinétique de remplissage, le rendement en grains dépend principalement de la quantité de rayonnement intercepté et donc de la durée du remplissage en jours, la vitesse de remplissage en carbone étant relativement constante ; tandis que la teneur en protéines est contrôlée par des processus fonction du temps thermique (*e.g.* dégradation des protéines foliaires), avec une compensation entre vitesse et durée d'accumulation en degrés jours.

L'accumulation d'amidon est un déterminant majeur du rendement en grains puisque ce composant représente 65 à 75% de la masse sèche du grain. Différentes enzymes interviennent au niveau des amyloplastes dans la synthèse d'amylose et d'amylopectine qui composent l'amidon. Brièvement, L'ADP-glucose pyrophosphorylase catalyse la formation d'ADP-glucose à partir de glucose-1-phosphate qui est ensuite converti en amylose par la "starch synthase" et en amylopectine par l'action d'enzymes de branchement. La réduction de l'accumulation d'amidon par les hautes températures, du fait de l'inactivation d'enzymes (Keeling et al., 1993) et d'une diminution de la transcription des gènes de synthèse de l'amidon (Hurkman et al., 2003), est un facteur majeur de diminution du rendement (Tashiro and Wardlaw, 1990). D'autre part, un stress thermique entraîne des modifications de la structure de l'amidon pouvant affecter la qualité du gain (Hurkman et al., 2003).

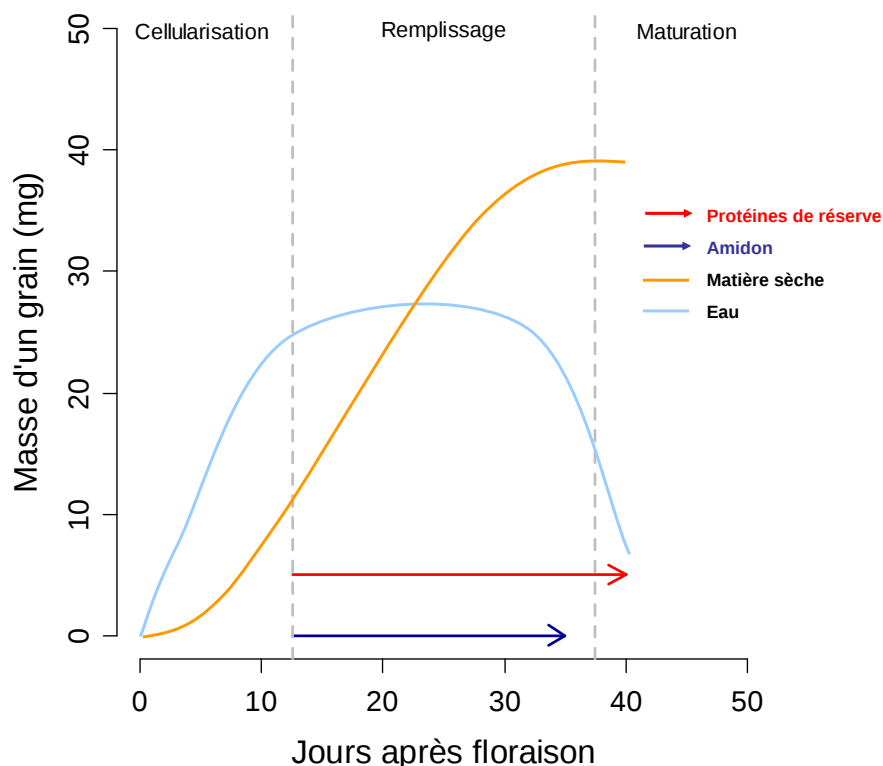


FIGURE 4.2 – Évolution de la masse sèche, de la masse fraîche et du contenu en eau du grain de blé au cours de son remplissage. Cette cinétique permet d'identifier différentes phases clés du développement du grain. La première phase de développement correspond à une phase de division cellulaire durant laquelle l'albumen se cellularise. Au cours de la seconde phase, les cellules de l'albumen croissent et accumulent de l'amidon, des protéines et de l'eau. L'accumulation d'eau se termine avant la fin de l'accumulation d'amidon et de protéines. Enfin, une phase de dessiccation correspond à la fin de l'accumulation d'amidon et de protéines. Le grain atteint alors sa maturité physiologique. D'après [Dupont and Altenbach \(2003\)](#).

Parmi les facteurs influençant l'accumulation d'amidon, la température et le statut hydrique ont un impact important ; ils modifient principalement la durée de remplissage ([Dupont and Altenbach, 2003](#)). Entre 15 et 20°C, la cinétique est optimale et maximise le remplissage. Au-delà de 20°C, la durée de remplissage est diminuée et la vitesse est affectée différemment selon les génotypes. Certains sont capables de compenser partiellement cette diminution de la durée par une augmentation de la vitesse de remplissage tandis que pour d'autres, la vitesse reste constante et, en conséquence, la masse des grains diminue. De même, un déficit hydrique au cours du remplissage induit une diminution de la durée de remplissage et la combinaison avec un stress thermique réduit la durée de remplissage davantage comparé à l'effet induit par un seul de ces stress ([Dupont and Altenbach, 2003](#)). L'effet des fertilisants sur la cinétique de remplissage du grain dépend de la quantité et du fractionnement des apports. De manière générale, l'apport d'engrais azotés augmente la durée de remplissage mais sans conséquences sur la masse des grains qui a même tendance à diminuer du fait du maintien de petit grains qui avortent en conditions de carence ([Altenbach et al., 2003](#)). Une conséquence bien connue des stress au cours du remplissage (en particulier d'un stress thermique) est l'échaudage des grains qui conduit à la formation de grains ridés de

petites tailles.

Les protéines présentes dans le grain de blé ont largement été étudiées. Elles représentent 8 à 20% de la masse du grain et sont classées parmi différentes catégories selon leur solubilité et leur mobilité électrophorétique (Shewry, 2009). Ces protéines sont à l'origine de la formation du gluten, réseau complexe de protéines, dont les propriétés visco-élastiques sont capitales en panification. L'intolérance au gluten peut-être à l'origine de la maladie coeliaque³ dont la prévalence est estimée à 1% dans les pays occidentaux (Dubé et al., 2005). Le gluten est composé à plus de 80% de protéines, le reste étant majoritairement des granules d'amidon piégés dans la matrice protéique (Shewry, 2009). Bien que les propriétés des protéines du gluten soient capitales pour la transformation agro-alimentaire, le rôle biologique de ces protéines reste mal compris (Shewry et al., 2003). Elles n'ont pas de fonctions physiologiques connues mais servent de source d'acides aminés au moment de la germination et durant les premiers jours de développement de la plantule. Parmi les différentes fractions composant le gluten, on trouve les gliadines et gluténines, synthétisées dans l'albumen au cours du remplissage du grain, qui composent environ 60 à 80% des protéines du grain. Parmi celles-ci, les gluténines de haut poids moléculaire (*HMW-GS*) ont une importance particulière dans le déterminisme de la qualité de la farine (Oury et al., 2010).

La quantité de protéines synthétisées dans l'albumen dépend de facteurs génétiques et environnementaux. Au niveau génétique, deux gènes paralogues en cluster (*Glu1-1* et *Glu1-2*) sur le bras long de chacun des chromosomes du groupe 1 (1AL, 1BL, 1DL), codent pour les *HMW-GS* et proviennent d'une duplication ancestrale (Kreis et al., 1985). Chez de nombreux cultivars, le gène *Glu1-2* du groupe A est inactif (Shewry et al., 2003). Les variations alléliques au niveau de ces gènes induisent des variations au niveau des différentes sous-unités formant les *HMW-GS*. Des facteurs qualitatifs (composition allélique) et quantitatifs (ratio *HMW-GS* / *LMW-GS*) sont également corrélés à des critères de qualité (Payne, 1987). L'expression des gènes de *HMW-GS* détermine la quantité de sous-unités produites et dépend de facteurs de régulation transcriptionnels et post-traductionnels (Storlie et al., 2009; Ravel et al., 2009).

L'influence des facteurs environnementaux sur les propriétés des farines de blé a été étudiée. Notamment, l'effet de la fertilisation azotée et soufrée (Kindred et al., 2008; Godfrey et al., 2010), de la disponibilité en eau et des hautes températures durant le remplissage du grain (Altenbach et al., 2003; Dupont et al., 2006). Ces facteurs sont susceptibles d'affecter la quantité, la composition et la polymérisation des protéines du gluten. L'apport de fertilisants azotés augmente la quantité de protéines et modifie la composition en protéines (Gupta et al., 1992). Une carence en soufre induit une augmentation des fractions ω -gliadines et *HMW-GS* (Wrigley et al., 1984) de même qu'un apport d'azote (Wieser and Seilmeier, 1998). Ceci peut être relié au fait que ces fractions sont majoritairement composées de glutamine et de proline, des acides aminés peu coûteux en terme métabolique et pouvant servir de réserve en azote lorsque cet élément devient limitant ou dans des conditions de carence en soufre (Dupont and Altenbach, 2003). L'effet de la température sur la composition en protéines dépend d'interactions génotype $\times$ environnement. Ainsi, la composition allélique modifie la réponse des génotypes aux températures élevées (Blumenthal et al., 1993). La teneur en protéines est susceptible d'augmenter avec la température du fait de ses effets distincts sur l'accumulation d'amidon et de protéines (Triboï et al., 2003). En effet, à l'inverse de l'amidon, il existe un mécanisme de compensation entre vitesse et durée de remplissage pour les protéines du grain. Ainsi, une diminution de la durée de remplissage, induite par un

3. Déformation des muqueuses intestinales conduisant à une diminution des capacités d'assimilation des nutriments à l'origine de carences alimentaires

stress thermique par exemple, est compensée par une augmentation de la vitesse d'accumulation des protéines (Triboï and Triboï, 2002). Ceci peut aboutir, du fait de la diminution de la quantité d'amidon accumulée dans les grains, à une augmentation de la concentration en protéines. De manière générale, les facteurs agro-climatiques entraînent des variations de teneur en protéines plus importantes que les facteurs d'ordre génétique (Cooper et al., 2001).

4.3 Difficultés rencontrées pour l'étude des déterminants du rendement en grains et de la teneur en protéines

L'étude des déterminants génétiques et écophysiologiques du rendement en grains et de la teneur en protéines est limitée par la complexité et la nature intégrative de ces deux caractères. Notamment, les effets environnementaux et les interactions génotype $\times$ environnement masquent leurs déterminants génétiques. Ainsi, la recherche de régions chromosomiques associées à des QTL pour le rendement en grains ou la teneur en protéines aboutit souvent à mettre en évidence des régions impliquées dans le déterminisme de caractères tels que la taille des plantes (gènes de nanisme *RHT*) ou la date de floraison (gènes de vernalisation *VRN* et de sensibilité à la photopériode *PPD*). L'utilisation, pour l'identification de régions chromosomiques responsables du déterminisme génétique du rendement en grains ou de la teneur en protéines, de populations de cartographie ne ségrégeant pas pour ces gènes majeurs permet de s'affranchir de l'effet de la phénologie (Pinto et al., 2010).

Une stratégie fréquemment employée consiste à décomposer ces caractères et à étudier séparément chacune des composantes. Ainsi, le déterminisme génétique et physiologique du nombre de grains (Cuthbert et al., 2008; McIntyre et al., 2010), de la masse des grains (Su et al., 2010) ou de leur taille (Gegas et al., 2010) ont été étudiés. Ce type d'étude présente l'inconvénient majeur de ne pas prendre en compte les interrelations entre ces différentes composantes du système telles que la relation négative entre le nombre de grains par unité de surface et la masse des grains, qui prédit qu'une augmentation du nombre sera suivie d'une diminution de la masse (Fischer, 2007).

L'utilisation d'approches combinant physiologie et génétique peuvent permettre de "décomplexifier" ces caractères. Ainsi, l'utilisation de modèles écophysiologiques suivie d'une recherche de régions chromosomiques associées à la variabilité mesurée pour les paramètres du modèle est une alternative prometteuse afin de révéler l'architecture génétique de caractères complexes tels que le rendement en grains ou la teneur en protéines (Bannayan et al., 2007; Chenu et al., 2009). Cette approche, qui permet de s'intéresser à des caractères *a priori* indépendants de l'environnement, a déjà été appliquée chez le pêcher pour l'étude de la variabilité génétique pour le contenu en sucres (Quilot et al., 2005), chez le maïs pour la réponse de la croissance des feuilles à la température et aux stress hydriques (Reymond et al., 2003), chez l'orge pour la date de floraison (Yin et al., 2005) et chez le blé pour l'efficacité d'utilisation de l'azote (Laperche et al., 2006).

Chapitre 5

Interconnexions entre métabolismes carbonés et azotés

Le carbone et l'azote sont deux éléments majeurs de la structure et du métabolisme des plantes. Le carbone compose les “briques élémentaires” (sucres, acides organiques) nécessaires à la production de l'ensemble des métabolites. L'azote entre dans la composition des acides nucléiques (ADN, ARN), des acides aminés qui composent les protéines nécessaires aux mécanismes métaboliques dont dépendent la croissance et le développement mais aussi d'autres molécules d'importance comme les polyamines ou bien encore la chlorophylle qui permet la captation de l'énergie lumineuse.

Des interconnexions existent entre les métabolismes du carbone et de l'azote, du niveau moléculaire au niveau de la plante entière. En effet, l'absorption, le transport, l'assimilation et la remobilisation de l'azote sont des processus nécessitant de l'énergie et des squelettes carbonés. Ils dépendent donc largement des capacités d'assimilation du carbone. En retour, l'assimilation du carbone et le métabolisme associé dépendent de l'activité de nombreuses enzymes et en premier lieu des capacités de captation de l'énergie lumineuse, et donc du métabolisme de l'azote (Figure 5.1 p.42).

Ce système est régulé *via* l'intégration par les plantes de signaux environnementaux (disponibilité en lumière, en CO₂, en nutriments) à différentes échelles. Ces systèmes de régulation impliquent différents signaux émanant de métabolites contenant de l'azote (glutamate, glutamine, aspartate) ou de signaux provenant du métabolisme du carbone (Lejay et al., 2003; Girin et al., 2007; Lejay et al., 2008).

5.1 Absorption de l'azote chez le blé

La nutrition azotée des plantes repose majoritairement sur l'absorption racinaire d'azote minéral (nitrate; NO₃⁻ et ammonium; NH₄⁺) et, dans certains systèmes, d'azote organique présents dans le sol (acides aminés, courtes chaînes peptidiques) ou d'azote gazeux (N₂) grâce à l'association plante - bactéries, notamment chez les fabacées. Dans le cas du blé, c'est majoritairement sous forme de nitrates que l'azote est prélevé dans la solution du sol (Hirel et al., 2007). L'absorption racinaire du nitrate est un processus actif (*i.e.* nécessitant de l'énergie). L'énergie nécessaire à ce processus provient de la dégradation des sucres au niveau des mitochondries, et donc de produits carbonés.

L'absorption racinaire du nitrate met en jeu des transporteurs membranaires spécifiques de deux types : les transporteurs à haute affinité (“High Affinity Transport System”; HATS) et les transporteurs à faible affinité (“Low Affinity Transport System”; LATS). Au sein

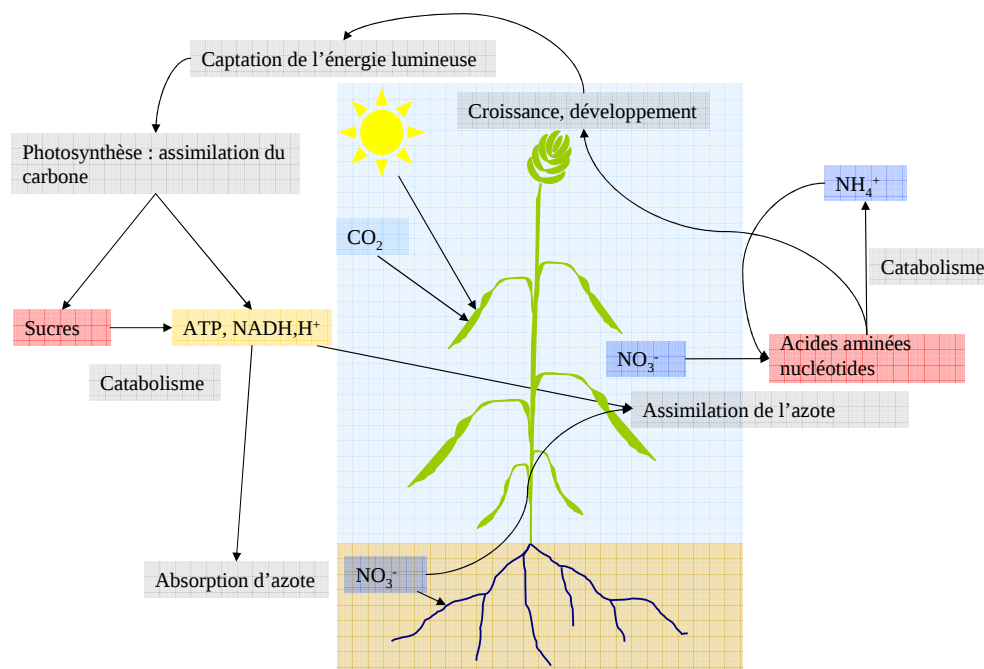


FIGURE 5.1 – Schéma général décrivant les interactions entre les processus liés au métabolisme du carbone et ceux liés au métabolisme de l'azote à l'échelle de la plante. La photosynthèse et le catabolisme des sucres fournissent l'énergie (ATP, NADH, H^+) nécessaire à l'absorption, au transport et à l'assimilation des nitrates, forme d'azote privilégiée chez le blé. En retour, la synthèse des acides aminés et des nucléotides permet la croissance et le développement des différents organes.

de chacune de ces catégories existent des sous-types différenciés selon leur inductibilité par les nitrates : les transporteurs constitutifs (cLATS, cHATS), actifs à faible concentration d'azote, et les transporteurs inducibles par l'azote (iLATS, iHATS).

Au-delà de leur inductibilité par l'azote, ces types se différencient également au niveau de leur activité et des concentrations en substrat pour lesquelles ils fonctionnent (vitesse maximale élevée mais saturation rapide pour les HATS, vitesse maximale faible mais fonctionnement maintenu à fortes concentrations en nitrates pour les LATS). Le premier gène codant pour un transporteur de nitrates a été isolé chez *A. thaliana* (*AtNRT1.1* ; (Tsay et al., 1993)). Il est généralement admis que les *NRT1* appartiennent aux LATS, à l'exception d'*AtNRT1.1* pour lequel l'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnel induisant un changement d'affinité de ce transporteur a été démontrée (Liu and Tsay, 2003), de même qu'un rôle possible dans le contrôle de l'architecture racinaire (Remans et al., 2006). Une seconde famille de gènes (*NRT2*) code pour des transporteurs de nitrates de type HATS. Leurs localisations varient en fonction de leurs rôles biologiques (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Des gènes homologues de la famille *NRT2* ont été identifiés chez différentes espèces dont le blé (Yin et al., 2007).

Des mécanismes de régulation transcriptionnelle de ces transporteurs sous l'effet des nitrates ou de la glutamine ont été mis en évidence (Glass, 2009). De plus, étant donné les besoins en énergie et la nécessité de squelettes carbonés pour l'absorption et l'assimilation des

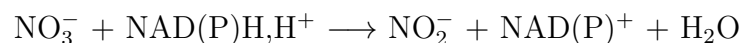
nitrate, la disponibilité en carbone est aussi un facteur de régulation des transporteurs de nitrates. Ainsi, la transcription de *NRT2.1* et l'influx de nitrates chez *A. thaliana* et *Nicotiana tabacum* est inhibée à l'obscurité et peut être partiellement rétablie par l'application de saccharose exogène (Matt et al., 2001).

À l'échelle de la plante entière, l'architecture racinaire influence l'absorption d'azote de par la quantité de racines mises en place, de la vitesse d'élongation des racines, de la densité racinaire ou bien encore de leur distribution dans le sol (Fitter et al., 2002) et ces différents caractères sont largement dépendants de l'assimilation carbonée (Brun et al., 2010). Un rétro contrôle existe puisque l'architecture racinaire est à son tour régulée par la disponibilité de l'azote du sol (Forde and Walch-Liu, 2009). La plasticité de l'expression des transporteurs et du développement racinaire permet aux plantes de modifier rapidement leur capacité à absorber les nitrates en fonction de leurs besoins et de la disponibilité en azote dans la solution du sol. En effet, la forte hétérogénéité des sols pour la concentration en azote inorganique additionnée aux variations saisonnières et même journalières de leurs besoins en azote ont conduit, au cours de l'évolution des plantes, à des systèmes permettant d'optimiser l'acquisition de cet élément et de maintenir son homéostasie (Glass et al., 2002).

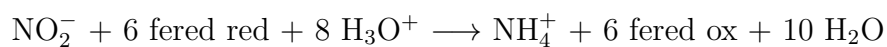
5.2 Assimilation de l'azote chez le blé

Une fois absorbés, les nitrates sont soit stockés dans la vacuole, soit assimilés dans les racines ou au niveau des feuilles après transport *via* le xylème (Figure 5.2 p.44). Là encore, il s'agit d'un processus actif nécessitant de l'énergie. L'assimilation de l'azote consiste en une réduction des nitrates en ammonium puis en une amination d'acides organiques pour former des acides aminés. La réduction des nitrates en ammonium se fait en deux étapes, majoritairement au niveau des feuilles chez les plantes herbacées comme le blé.

1. réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase (NR). Cette enzyme est localisée dans le cytosol et nécessite un cofacteur donneur d'électrons (NADH ou NADPH).



2. réduction des nitrites en ammonium par la nitrite réductase (NiR). Cette enzyme est localisée dans les chloroplastes et nécessite un cofacteur donneur d'électrons, la férédoxine (ferred).



La régulation des activités NR et NiR se réalise à différents niveaux (Lea et al., 2006). Au niveau transcriptionnel, il a été mis en évidence une régulation de l'expression de ces gènes par des facteurs environnementaux (disponibilité en nitrates et en eau, lumière) et par des facteurs endogènes (glutamine, sucres, hormones) mais ce niveau de régulation n'aurait qu'un rôle mineur. Au niveau post-traductionnel, une régulation de la NR par phosphorylation/déphosphorylation permet respectivement une inactivation/activation rapide de cette enzyme en fonction des conditions environnementales.

L'ammonium, qui est un composé toxique, est ensuite rapidement incorporé par des réactions d'amination à des acides organiques pour former des acides aminés. Cet ion provient à la fois de la réduction des nitrates mais aussi du catabolisme des protéines et de la photorespiration. La principale voie d'incorporation de l'ammonium aux acides aminés passe par la transformation en glutamine sous l'action de la glutamine synthétase (GS) puis la formation de glutamate par la glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase ou glutamate synthase (GOGAT). Ces deux enzymes fonctionnent de concert, on parle de cycle GS/GOGAT. La

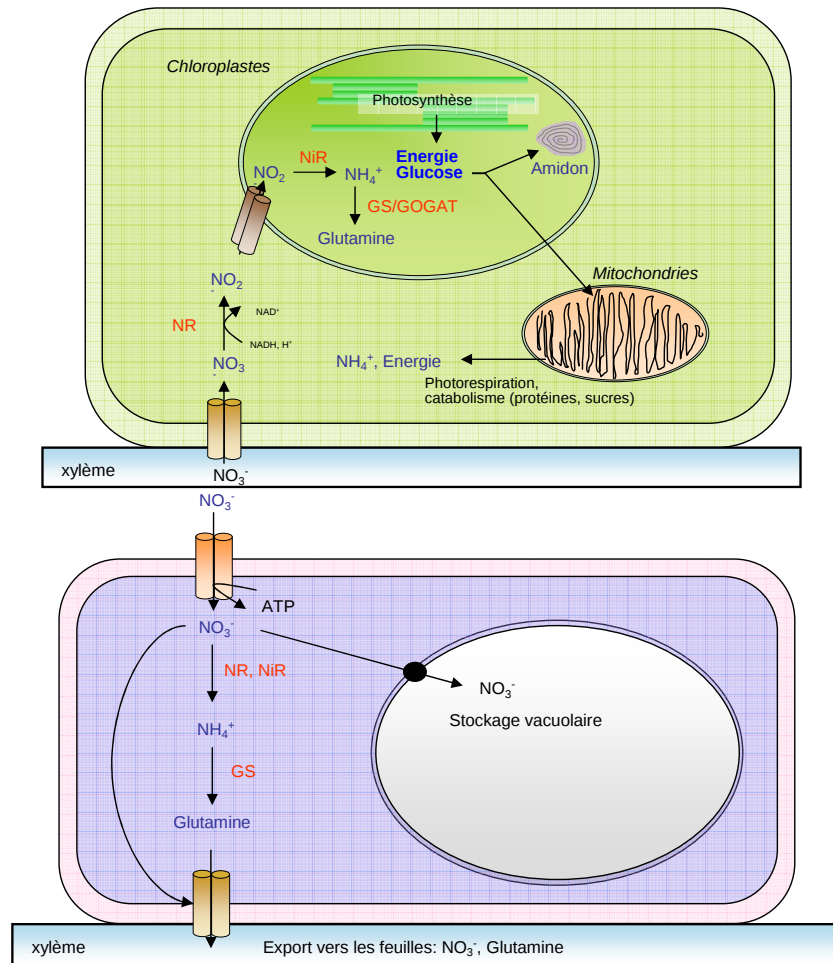


FIGURE 5.2 – Schéma simplifié décrivant l'absorption et l'assimilation de l'azote chez le blé. Le nitrate (NO_3^-) est la forme privilégiée d'acquisition de l'azote chez le blé. Une fois absorbés à travers des transporteurs spécifiques, le NO_3^- est soit stocké dans les vacuoles, soit assimilé au niveau des cellules racinaires, soit transporté *via* les vaisseaux du xylème jusqu'aux cellules du mésophylle foliaire pour y être assimilés. L'assimilation des nitrates se réalise en trois étapes : une étape de réduction de NO_3^- en nitrites (NO_2^-) par la nitrate réductase (NR) puis de NO_2^- en ammonium (NH_4^+) par la nitrite reductase (NiR) et une étape d'amination d'acides organiques aboutissant à la formation de glutamine par le cycle glutamine synthase / glutamate synthase (GS/GOGAT). L'énergie (ATP, NADH, H^+) nécessaire à tous ces processus est fournie par la photosynthèse, la respiration ou la photorespiration.

GS catalyse l'amination d'une molécule de glutamate en présence d'ATP puis la GOGAT, par une réaction de transamination, transfère le groupement amide de la glutamine à l' α -cétooglutarate pour former deux molécules de glutamate. L'une pourra réalimenter le cycle GS/GOGAT et l'autre servira de substrat pour la synthèse d'autres acides aminés. Une autre enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH), permet de cataboliser *in vitro* une réaction réversible de désamination du glutamate pour libérer du α -cétooglutarate et de l'ammonium. Cette enzyme fonctionnerait *in vivo* dans le sens de la désamination, contribuant ainsi à ajuster le rapport C/N en fonction des besoins cellulaires (Miflin and Habash, 2002).

Les GS sont présentes au niveau des chloroplastes (*GS2*) et du cytosol (*GS1*) avec des fonctions biologiques différentes selon leurs localisations. Notamment, la GS cytosolique, présente dans les tissus vasculaires (xylème, phloème), a un rôle prépondérant lors de la remobilisation de l'azote en recyclant l'ammonium produit lors du catabolisme des protéines par les protéinases (Masclaux et al., 2001). La *GS1* a reçu beaucoup d'attention suite aux travaux conduits sur le maïs qui ont montré une colocalisation entre gènes de structure, QTL d'activité enzymatique et QTL de masse des grains (Hirel et al., 2001). La *GS2*, localisée au niveau du stroma des chloroplastes, intervient dans le cycle GS/GOGAT. L'expression, la localisation et la fonction des GS ont été étudiées chez le blé (Bernard et al., 2008; Bernard and Habash, 2009). Trois gènes *GS1* et un gène *GS2* ont été identifiés par génome diploïde (Bernard et al., 2008). De la variabilité génétique pour l'activité GS au niveau des feuilles a été mise en évidence chez le blé, ce qui indique qu'il s'agit d'une cible potentielle en amélioration variétale (Kichey et al., 2006; Bernard et al., 2008). Des QTL d'activité GS ont été détectés mais seule une colocalisation entre gène de structure, QTL d'activité et QTL agronomique a été rapportée sur le chromosome 4B au voisinage du gène *RHT1* (Fontaine et al., 2009). Récemment, (Li et al., 2010) ont montré une association significative entre le polymorphisme des gènes de la *GS2* sur le groupe homéologue 2, l'absorption d'azote et la teneur en protéines du grain chez le blé tendre.

L'activité GS est contrôlée par un réseau complexe de signaux métaboliques à différentes échelles (Mifflin and Habash, 2002). La vitesse d'assimilation de l'azote inorganique au niveau des feuilles est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité, reflétant l'importance de la photosynthèse pour la fourniture d'énergie à la voie métabolique d'assimilation de l'azote (Reed et al., 1983; Matt et al., 2001). A ce titre, le potentiel rédox, à travers la concentration en NADH, joue un rôle important dans la régulation de l'assimilation de l'azote (Dutilleul et al., 2005). L'assimilation de l'azote dépend non seulement de la photosynthèse mais aussi de l'activité respiratoire et photorespiratoire pour la fourniture d'énergie et d'ammonium, respectivement. En retour, l'allocation des assimilats carbonés entre les voies de synthèse des acides organiques ou de l'amidon est affectée par la disponibilité en azote (Murchie et al., 2000).

5.3 Remobilisation de l'azote et sénescence monocarpique chez le blé

Au cours de la période de remplissage des grains, le carbone et l'azote acquis et stockés sous formes minérales ou organiques dans les différents organes sont remobilisés sous des formes labiles (*e.g.* glutamine, saccharose) vers les grains en développement et servent de substrats aux enzymes de synthèse de l'amidon et des protéines de réserves notamment. Ce processus permet d'assurer le remplissage des grains en carbone et en azote en tamponnant les fluctuations temporelles de la disponibilité des ressources. Notamment, dans des climats où le remplissage des grains se réalise sous des conditions de stress hydrique ou thermique important, ce mécanisme permet l'évitement de ces contraintes abiotiques. On estime que, selon les conditions agro-climatiques, 40 à 90% de l'azote des grains provient de la remobilisation (Sanford and MacKown, 1986; Kichey et al., 2007).

La remobilisation de nutriments des organes sources (photosynthétiquement actifs) vers les organes puits se réalise tout au long de la période végétative, les feuilles en développement jouant successivement un rôle de puits et de sources pour les organes plus jeunes. Chez les plantes monocarpiques dont fait partie le blé tendre, la période de remplissage des

grains se caractérise par une forte induction de la remobilisation qui se traduit par la sénescence complète de l'ensemble de l'appareil végétatif. Au niveau moléculaire, ce processus correspond à une mort cellulaire programmée se traduisant par une perte des pigments et une déshydratation des feuilles (Gan et al., 2007). En effet, la majeure partie des protéines dégradées sont chloroplastiques, l'enzyme rubisco étant quantitativement la plus importante fraction de l'azote des feuilles. La dégradation des protéines chloroplastiques s'accompagne de changements ultra-structuraux au niveau des chloroplastes (accroissement des espaces inter-thylakoidiens, disparition des *grana*, diminution du système de membranes thylakoïdiennes) et d'une diminution du nombre de chloroplastes par cellule. Quelques centaines de gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des protéines au cours de la sénescence et les voies de régulation de ce catabolisme ont été identifiés chez les plantes et en particulier chez le blé et l'orge (Gregersen and Holm, 2007; Parrott et al., 2007; Martínez et al., 2008).

La cinétique de sénescence est régulée par des facteurs génétiques et environnementaux et illustre les interconnexions entre métabolisme carboné et azoté à l'échelle du couvert (Lim et al., 2007). En effet, d'un côté le potentiel d'assimilation du carbone durant la période de remplissage des grains est déterminée à la fois par la date du début et la vitesse de la sénescence (Thomas and Howarth, 2000; Spano et al., 2003). D'un autre, la persistance de la surface verte et photosynthétiquement active permet de maintenir l'allocation de squelettes carbonés et d'énergie nécessaires au fonctionnement racinaire et à l'absorption d'azote durant la période post-floraison (Borrell and Hammer, 2000).

L'intérêt porté en amélioration des plantes à la cinétique de sénescence tient dans le fait que différentes études ont montré que le maintien de la surface foliaire verte et active durant la période floraison - maturité (phénotype "stay-green" fonctionnel) permet une augmentation du rendement en grains du fait d'une prolongation de la période d'assimilation du carbone (Thomas and Howarth, 2000). Le rendement en grains élevé d'un hybride de type "stay-green" chez le blé a été relié au retardement de sa sénescence (Gong et al., 2005) et une étude comparant deux cultivars de blé de printemps a montré que les différences de rendement en grains entre ces deux cultivars étaient à mettre en relation avec le retardement du déclin de l'appareil photosynthétique (Zhang et al., 2006). Bien que le caractère "stay-green" confère un rendement en grains élevé, celui-ci induit également une diminution de l'efficacité de remobilisation de l'azote et de l'indice de récolte (Gong et al., 2005). A l'inverse, une sénescence accélérée (phénotype "early-senescent") augmente l'efficacité de remobilisation et la teneur en protéines mais diminue le rendement en grains (See et al., 2002). En conséquence, un "ideotype idéal" recherché en amélioration des plantes devrait combiner à la fois le retardement de la sénescence des feuilles et la capacité à remobiliser rapidement et efficacement l'azote, notamment en conditions non stressantes (Thomas and Stoddart, 1980; Gregersen et al., 2008).

Chapitre 6

La relation négative teneur en protéines - rendement en grains chez le blé

L'augmentation du rendement en grains des cultures de blé a été accompagnée d'une baisse de la teneur en protéines (Figure 10.1 p.76). En France, les rendements en blé sont passés de 5.5 t ha^{-1} en 1986 à $7,3 \text{ t ha}^{-1}$ en 2008 et la teneur en protéines de 13.4 à 11.5% sur la même période. Il a été estimé qu'une augmentation du rendement de 1 t ha^{-1} est suivie d'une baisse concomitante de la teneur en protéines de $1\text{g}/100\text{g}$ matière sèche (Le Buanec, 1999; Oury et al., 2003; Triboï et al., 2006).

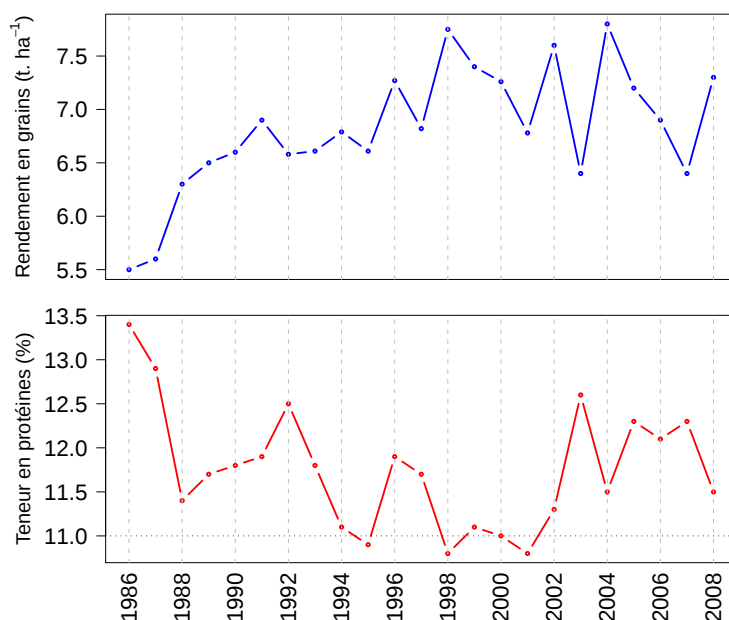


FIGURE 6.1 – Évolution du rendement en grains et de la teneur en protéines des blés récoltés en France de 1986 à 2008. L'augmentation du rendement en grains et la baisse concomitante de la teneur en protéines est attribuée à la relation négative teneur en protéines - rendement en grains. La ligne tireté grise représente le seuil de 11% de teneur en protéines en deçà duquel des pénalités commerciales sont appliquées à l'export. Source : “La France Agricole”.

Cette tendance est attribuée à la relation négative teneur en protéines du grain - rendement en grains qui résulte des interconnexions entre métabolismes carbonés et azotés. Cette corrélation négative a été observée depuis très longtemps chez le blé (Grant and McCalla, 1949). De manière analogue, des relations négatives entre le rendement en grains et la teneur en huile chez le tournesol (Aguirrezábal et al., 2009) ou le rendement en fruits et la teneur en sucres chez la tomate (Prudent et al., 2009) ont également été observées. Il a été envisagé que la focalisation sur le rendement en grains, au cours de l'amélioration variétale du blé, a conduit à une augmentation de l'assimilation du carbone et de sa translocation vers les grains sans augmenter en retour l'absorption et la remobilisation de l'azote (McNeal and Berg, 1978).

6.1 Déterminisme de la relation négative teneur en protéines - rendement en grains

La relation négative teneur en protéines - rendement en grains a fait l'objet de nombreuses études chez les céréales, dont le blé tendre en particulier, mais son déterminisme reste mal compris. Néanmoins, en se basant sur la littérature portant sur ce sujet, trois hypothèses principales sont proposées.

6.1.1 Compétition pour l'énergie

Il a été proposé que la compétition entre les métabolismes carbonés et azotés pour les squelettes carbonés au cours de la période de remplissage des grains pourrait expliquer cette relation négative (Bhatia and Rabson, 1976). Penning et al. (1974) ont calculé le coût énergétique en équivalent glucose de la production d'hydrates de carbone, de protéines et de lipides. Sur la base de leurs calculs, 1g de glucose peut être investi pour la production de 0.83g d'hydrates de carbone, de 0.4g de protéines ou de 0.33g de lipides.

Ces considérations bioénergétiques permettent d'expliquer les différences inter-spécifiques de rendement (Munier-jolain and Salon, 2005). Ainsi, les espèces à forte teneur en protéines ou à forte teneur en huile présentent un rendement en grains plus faible que les espèces telles que les céréales, pour lesquelles le grain est riche en hydrates de carbone. Cette hypothèse ne prend pas en compte la "rentabilisation" du coût énergétique de l'assimilation de l'azote par la contribution de cet élément à l'assimilation carbonée (Bänziger et al., 1994).

6.1.2 Variabilité génétique pour la durée de sénescence des feuilles après floraison

Cette hypothèse n'a pas été formulée *in extenso* par les auteurs qui ont étudié les bases biologiques de la relation teneur en protéines - rendement en grains. Néanmoins, nous la formulons car des arguments épars semblent la soutenir suffisamment.

Chez les plantes telles que le blé, pour lesquelles la majorité de l'azote du grain provient de la remobilisation et pour lesquelles les protéines non solubles constituent environ 80% des protéines des feuilles, l'activité des protéases est cruciale pour la remobilisation de l'azote vers les grains en développement et *in fine* le rendement en protéines (Feil, 1997). L'activité de ces enzymes, qui assurent le catabolisme des protéines et fournissent de l'azote sous une forme labile, transférable à travers les vaisseaux du phloème, conditionne en partie la durée de fonctionnement du couvert durant la période post-floraison. Il a été montré, en comparant

différents géotypes de maïs présentant des rendements en grains similaires mais des teneurs en protéines différentes, que l'activité protéolytique est plus importante que l'activité nitratre réductase pour atteindre une teneur en protéines élevée (Reed et al., 1980). D'autre part, il a été montré une relation entre la vitesse de remobilisation de l'azote des feuilles en cours de sénescence et l'activité protéase acide chez le blé (Dalling et al., 1976). Ces auteurs proposent que la remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains accélère la sénescence et diminue la durée de remplissage des grains.

Ceci est à mettre en regard des études portant sur les relations entre cinétique de sénescence et rendement en grains et plus généralement sur le caractère dual de ce processus vis-à-vis de l'assimilation du carbone et de la remobilisation de l'azote. En effet, la sénescence monocarpique contribue de manière antagoniste à ces deux processus ; un retardement ou un ralentissement de la sénescence conduisant à une augmentation de la quantité d'assimilats carbonés et à une diminution concomitante de l'efficacité de remobilisation de l'azote (Gergsen et al., 2008). De fait, l'existence d'une variabilité génétique associée aux paramètres de cinétique de sénescence (date de début, vitesse) est susceptible d'aboutir à une relation négative entre la teneur en protéines et le rendement en grains. Dans ce cadre, il est attendu que les géotypes à sénescence rapide ("early senescent") assimilent moins de carbone après floraison et remobilisent l'azote des parties végétatives plus efficacement, aboutissant ainsi à un rendement en grains faible mais à une teneur en protéines élevée. A l'inverse, les géotypes à sénescence lente ou retardée ("stay-green") seraient caractérisés par une assimilation plus importante de carbone conduisant à une forte dilution des protéines du grain renforcée par leur plus faible efficacité de remobilisation de l'azote. Ces derniers atteindraient alors des rendements en grains élevés mais des teneurs en protéines faibles.

6.1.3 Incompatibilité génétique

Différents auteurs ont proposé l'existence de facteurs génétiques expliquant la relation teneur en protéines - rendement en grains (Pepe and Robert, 1975; Miezan et al., 1977; McNeal and Berg, 1978). Sur le plan génétique, l'existence d'une relation négative implique la présence de gènes à effets antagonistes fortement liés génétiquement ou bien la présence de gènes à effets pleiotropes affectant les deux caractères à la fois. Dans ce cas, un gène pleiotrope pourrait être défini comme déterminant un processus physiologique à effet antagoniste sur le rendement en grains et la teneur en protéines (*e.g.* la cinétique de sénescence). Kibite and Evans (1984) mettent en avant le fait que rendement en grains et teneur en protéines sont sous l'influence de nombreux gènes présent sur différents chromosomes ; ce qui est par ailleurs supporté par les nombreuses détections de QTL réalisées pour ces deux caractères (Perretant et al., 2000; Zanetti et al., 2001; See et al., 2002; Blanco et al., 2002; Groos et al., 2003; Prasad et al., 2003; Turner et al., 2004; Charmet et al., 2005; Kulwal et al., 2005; Blanco et al., 2006; Huang et al., 2006; Laperche et al., 2007; Suprayogi et al., 2009). Ceci rend peu probable l'hypothèse d'une incompatibilité génétique stricte mais n'exclut pas la présence de gènes à effets pleiotropes.

6.2 Facteurs de variation de la relation négative teneur en protéines - rendement en grains

La relation négative teneur en protéines-rendement en grains est extrêmement variable et dépend du panel de géotypes (Marinciu and Săulescu, 2008) et des environnements

d'étude (r^2 variant de 15 à 60% selon les environnements (Oury et al., 2003)). Du fait de cette forte variabilité, cette relation a d'abord été envisagée comme étant le produit d'effets environnementaux (Kibite and Evans, 1984). Mais il apparaît clairement qu'elle est en partie déterminée génétiquement car les variétés ont des comportements répétables bien que largement influencés par les interactions génotype $\times$ environnement (Oury et al., 2003).

L'utilisation de valeurs moyennes pour le rendement en grains et la teneur en protéines, obtenues sur différents génotypes expérimentés sous différentes conditions agro-climatiques, permet de moyenniser les interactions génotype $\times$ environnement et révèle ainsi une relation forte ($r^2 \approx 50\%$ (Oury et al., 2003)). Un panel d'environnements composé de cinq lieux $\times$ deux années apparaît nécessaire pour obtenir une bonne évaluation de la relation négative teneur en protéines-rendement en grains (Oury and Godin, 2007). Cette relation est plus forte (r^2 plus élevé) lorsque le panel de génotypes utilisés pour l'évaluer présente une forte variabilité pour le rendement en grains ou la teneur en protéines (Kibite and Evans, 1984; Oury et al., 2003).

Ainsi, les facteurs génétiques ou environnementaux affectant le rendement en grains sont susceptibles de modifier la relation teneur en protéines - rendement en grains; cette relation étant alors envisagée comme résultant d'un effet de dilution de l'azote du grain par les molécules riches en carbone. Dans ce cadre, les facteurs favorisant le rendement en grains sont autant de facteurs de dilution des protéines. Ce cadre conceptuel est établi sur la base du fait que les facteurs climatiques affectent différemment la vitesse et la durée d'accumulation de l'amidon et des protéines (Triboï and Triboï, 2002).

Ainsi, les facteurs ayant potentiellement un impact positif sur l'assimilation du carbone (augmentation de la concentration en CO_2 , rayonnement incident) entraînent une baisse de la concentration en azote du grain telle que prédite par la relation négative teneur en protéines - rendement en grains (Pleijel et al., 1999). A l'inverse, ceux favorisant une diminution de la durée du remplissage (déficit hydrique et température élevée après floraison) diminuent le rendement à l'échelle du mètre carré, du fait d'une diminution de la matière sèche des grains, et augmentent la concentration en azote. Ces facteurs limitants ne modifiant pas la structure du couvert et le rapport puits : sources aboutissent ainsi à une corrélation négative teneur en protéines-rendement en grains très similaire quelle que soit l'échelle d'observation (Figure 6.2 p.51).

Par contre, les facteurs limitants provoquant des modifications de la structure du couvert (déficit hydrique pré-floraison, ablation d'épis), associés à une baisse du ratio puits : sources (diminution du nombre d'épis, du nombre de grains par épis), conduisent à une augmentation de la teneur en azote à l'échelle du grain mais à une diminution à l'échelle du mètre carré. En effet, sous ces conditions, le rendement en grains est limité par le nombre de puits, ce qui conduit à une baisse de la masse des grains et donc à une augmentation de la teneur en azote à l'échelle du grain. En revanche, la baisse du nombre d'épis et du nombre de grains par épis impacte fortement le rendement en grains par mètre carré, ce qui aboutit à une diminution de l'ordonnée à l'origine de la relation rendement en grains - teneur en protéines. En conditions de stress azoté, l'ordonnée à l'origine diminue et la pente de la relation augmente en valeur absolue, la concentration en azote du grain devenant plus sensible aux variations de rendement (Simmonds, 1995; Triboï et al., 2006) (Figure 6.2 p.51).

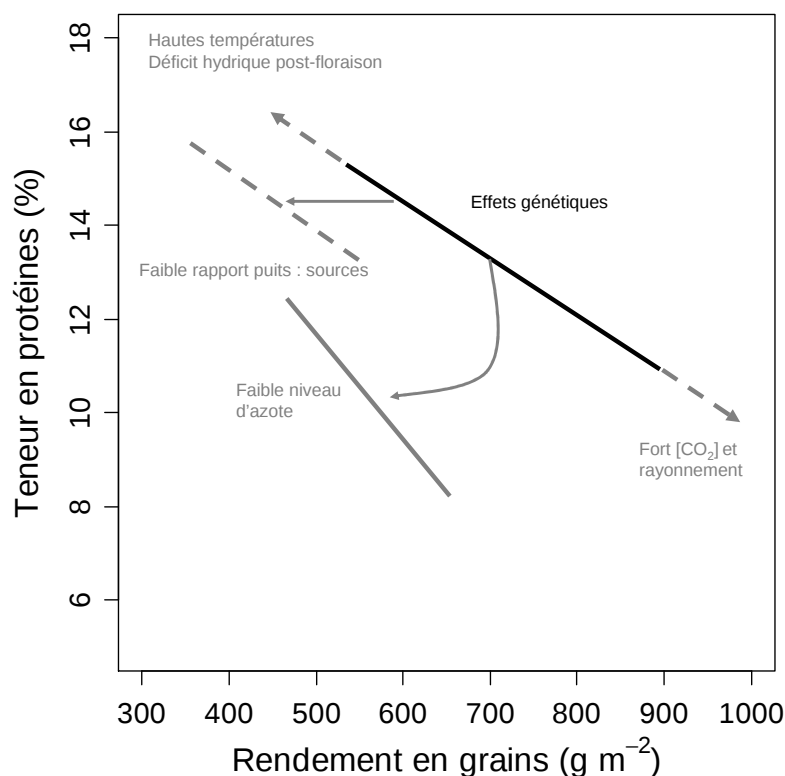


FIGURE 6.2 – Schéma conceptuel illustrant les effets de différents facteurs agro-climatiques sur la relation teneur en protéines-rendement en grains. De manière générale, les facteurs favorisant l’assimilation du carbone (rayonnement, CO_2) entraînent une baisse de la concentration en azote du grain telle que prédite par la relation négative teneur en protéines - rendement en grains. A l’inverse, ceux favorisant une diminution de la durée du remplissage (déficit hydrique post-floraison, hautes températures) diminuent le rendement en grains et augmentent la concentration en azote du grain. Par contre, les facteurs associés à une baisse du ratio puits : sources (déficit hydrique pré-floraison, ablation d’épis) entraînent une diminution de l’ordonnée à l’origine de la relation rendement en grains - teneur en protéines. Enfin, en conditions de stress azoté, l’ordonnée à l’origine et la pente de la relation diminuent en valeur absolue et la concentration en azote devient plus sensible aux variations de rendement en grains. D’après [Triboï et al. \(2006\)](#).

6.3 Les perspectives d’amélioration du rendement en grains et de la teneur en protéines

L’amélioration des capacités d’assimilation du carbone en ciblant des mécanismes biochimiques de la photosynthèse semble difficile à atteindre ([Lawlor, 2002](#)) bien que des études de transgénèse ayant introduit des enzymes clés de la photosynthèse de type C4 du maïs chez le riz semblent avoir été couronnées de succès ([Ku et al., 2000](#)). Au cours de l’amélioration du rendement en grains chez le blé, les progrès les plus significatifs n’ont pas porté sur la quantité de biomasse accumulée mais plutôt sur son allocation au cours du développement. L’introduction de gènes de nanisme (*RHT*), considérés comme les gènes de la “révolution

verte”, dans des variétés élités par Norman Borlaug, ingénieur au CIMMYT¹ et depuis prix Nobel de la paix, a permis d’améliorer fortement l’indice de récolte (rapport biomasse des grains / biomasse totale) et d’utiliser plus intensivement les fertilisants azotés.

Or, dans un contexte économique et environnemental appelant à limiter les apports de fertilisants azotés, l’amélioration de l’efficacité de l’utilisation de l’azote apparaît nécessaire afin de maintenir les rendements tout en diminuant la consommation de fertilisants. L’efficacité d’utilisation de l’azote (NUE ; “Nitrogen Use Efficiency”) est définie comme le rendement en grains par unité d’azote disponible dans le sol au cours de la culture (fertilisant et azote minéralisé compris). Elle peut être décomposée en une efficacité d’absorption (azote total à maturité par unité de fertilisant azoté) et une efficacité d’assimilation de l’azote (rendement en grains par unité d’azote total à maturité).

De manière générale, l’efficacité d’absorption de l’azote des plantes cultivées est faible ; de l’ordre de 50% de l’azote total disponible (Hirel et al., 2007). Techniquement, afin d’améliorer la NUE, deux voies sont envisageables : l’utilisation de la variabilité pour l’utilisation de l’azote disponible dans le pool de gènes d’une espèce donnée (sélection phénotypique, sélection assistée par marqueurs, introgression de gènes provenant d’espèces apparentées) ou l’introduction de “nouveaux” gènes (transgénèse, mutagénèse). Ainsi, par exemple, des études sur des populations de cartographie ont permis de mettre en évidence la colocalisation de QTL pour l’activité GS, la quantité d’azote et le rendement chez le maïs (Hirel et al., 2001; Masclaux et al., 2001), le riz (Obara et al., 2001) et le blé (Fontaine et al., 2009) ce qui suggère qu’une amélioration est possible par sélection assistée par marqueurs. D’autre part, des études portant sur du matériel transgénique chez différentes espèces dont le blé suggèrent que l’addition d’une GS pourrait conduire à améliorer la NUE (Habash et al., 2001; Yamaya et al., 2002; Andrews et al., 2004) de même que la sur-expression d’une alanine aminotransférase (Shrawat et al., 2008). D’autres gènes impliqués dans l’absorption et l’assimilation de l’azote sont susceptibles d’être utilisés afin d’améliorer la NUE par voie transgénique (Good et al., 2004).

La relation négative teneur en protéines - rendement en grains prédit qu’une augmentation du rendement en grains (ou de la NUE), entraîne une diminution de la teneur en protéines. Pour contrecarrer les effets négatifs de cette relation, une stratégie consiste à fractionner les apports d’azote et à appliquer le dernier apport autour du stade épiaison (Oury et al., 2003). Cette pratique comporte le risque que cet apport tardif d’azote soit peu valorisé car elle repose sur le fait que les conditions pédoclimatiques, en particulier la disponibilité en eau, soient favorables à l’absorption d’azote post-floraison. Dans le cas contraire, cet apport tardif d’azote serait peu valorisé et pourrait être à l’origine de conséquences négatives sur les écosystèmes. D’autres stratégies dans le champ de l’amélioration variétale ont été suggérées comme cibler l’indice de récolte de l’azote et l’absorption d’azote (Dubois and Fossati, 1981), cibler le rendement en azote ou la teneur en protéines au-dessus d’un seuil de rendement prédéfinis (Monaghan et al., 2001), l’utilisation d’indices de sélection (Iqbal et al., 2007) ou l’introgression de gènes augmentant la teneur en protéines en provenance d’espèces apparentées (Mesfin et al., 1999).

1. International Maize and Wheat Improvement Center (<http://www.cimmyt.org/>)

Chapitre 7

L'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains ou GPD

Monaghan et al. (2001) ont suggéré d'utiliser l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains ou GPD ("Grain Protein Deviation"), qui correspond aux résidus statistiques de la relation (Figure 7.1 p.53), afin d'identifier les géotypes présentant une teneur en protéines plus élevée que celle prédite par la relation teneur en protéines - rendement en grains.

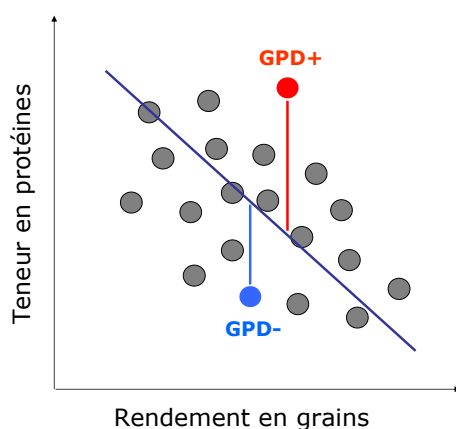


FIGURE 7.1 – L'écart à la relation teneur en protéines-rendement en grains ou GPD ("Grain Protein Deviation") est défini comme les résidus de la régression expliquant la teneur en protéines par le rendement en grains. Un exemple de GPD positif et de GPD négatif est présenté.

Par définition, la moyenne du GPD est nulle et 95% des valeurs de GPD standardisées sont comprises entre -1.96 et $+1.96$ (propriétés des résidus de régression linéaire). Il est à noter que la corrélation entre GPD et teneur en protéines dépend du coefficient de détermination de la relation teneur en protéines - rendement en grains : plus la relation teneur en protéines - rendement en grains est faible et plus la corrélation entre GPD et teneur en protéines est forte (cf *addendum*).

Suite aux travaux de [Oury and Godin \(2007\)](#), une bonification est attribuée aux génotypes présentant un GPD significativement positif (résidus standardisés > 1.96) lors de l'évaluation des cultivars en cours d'inscription au catalogue Français par le CTPS¹. Bien que les génotypes s'écartant significativement de cette relation ne puissent être identifiés dans les générations précoces des programmes de sélection, ils peuvent l'être plus tard à condition de mesurer systématiquement le rendement en grains et la teneur en protéines. L'évaluation du GPD en terme de calcul et de dispositif expérimental a été étudiée ([Oury and Godin, 2007](#)). Ces auteurs ont mis en avant la nécessité d'évaluer le rendement en grains et la teneur en protéines dans un panel de conditions environnementales suffisant afin de s'affranchir des interactions génotype $\times$ environnement qui masquent la relation. Ils ont par ailleurs proposé un algorithme qui permet de réduire l'influence des outliers dans le calcul des paramètres de la régression teneur en protéines - rendement en grains afin d'estimer précisément le GPD et de limiter l'impact du panel de génotypes utilisé pour évaluer les paramètres de la régression teneur en protéines - rendement en grains ([Marinciu and Săulescu, 2008](#)). Bien que le GPD soit d'ores et déjà utilisé en France dans l'évaluation des variétés en cours d'inscription et apparaisse comme une cible intéressante pour étudier la variabilité génétique pour les mécanismes physiologiques à l'interface entre les métabolismes du carbone et de l'azote, ses bases biologiques restent mal connues.

7.1 Hypothèses sur les bases biologiques du GPD

Quelques études proposent des pistes d'études intéressantes afin de mettre en évidence des caractères affectant séparément le rendement en grains et la teneur en protéines. Ces études indiquent que des mécanismes physiologiques responsables d'une plus forte absorption et / ou remobilisation de l'azote pourraient affecter différenciellement les métabolismes du carbone et de l'azote. D'autre part, de la variabilité génétique existe à la fois pour la quantité d'azote remobilisé, son efficacité de remobilisation et l'absorption d'azote post-floraison ([Cox et al., 1986](#); [Sanford and MacKown, 1986](#); [Le Gouis et al., 2000](#); [Kichey et al., 2007](#)). [Monaghan et al. \(2001\)](#) suggèrent d'ailleurs qu'une augmentation de la quantité d'azote absorbée après floraison combinée avec une meilleure efficacité de remobilisation de l'azote pourrait expliquer le GPD.

7.1.1 La remobilisation de l'azote vers les grains en cours de remplissage

La remobilisation de l'azote absorbé avant floraison représente 60 à 90% de l'azote des grains ([Barbottin et al., 2005](#)). Elle dépend à la fois de la quantité d'azote absorbée avant floraison et de l'efficacité de remobilisation de cet azote au cours de la période post-floraison. L'efficacité de remobilisation, définie comme le rapport entre la quantité d'azote remobilisée vers les grains et la quantité d'azote absorbée avant floraison, dépend des conditions pédo-climatiques durant la période post-floraison et notamment de la disponibilité de l'azote. Selon [Barbottin et al. \(2005\)](#), en conditions optimales (notamment en l'absence de carence azotée), l'efficacité moyenne de remobilisation est indépendante du génotype considéré et tourne autour de 76%. Par contre, en situation de stress (déficit hydrique post-floraison, carence en azote, maladies), des disparités apparaissent entre génotypes. L'ampleur des variations génétiques rapportées en conditions de faible disponibilité en azote est de l'ordre de

1. CTPS : Comité Technique Permanent de la Sélection (<http://www.geves.fr/index2.php>)

10-15% en utilisant un marquage ^{15}N , soit par exemple de 70 à 85% (Kichey et al., 2007).

L'étude la plus convaincante reliant efficacité de remobilisation et teneur en protéines est celle conduite sur blé dur ayant aboutie au clonage du gène *NAM-B1*. Un QTL a été identifié sur le bras court du chromosome 6B à partir d'une population de lignées recombinantes issues du croisement *T. turgidum* ssp. *durum* $\times$ *T. turgidum* ssp. *diccocoïdes* (Joppa et al., 1997). Le clonage positionnel du QTL a permis d'identifier un facteur de transcription de la famille des NAC, dénommé *NAM-B1*, responsable du QTL *GPC-B1*, accélérant la sénescence et augmentant la teneur en protéines (Uauy et al., 2006). Il est à noter que ce QTL a des effets variables sur la masse des grains en fonction des environnements étudiés et que le rendement en grains des lignées ayant introgressé ce QTL n'a pas été mesuré en conditions "agronomiques". Il a par ailleurs été montré que ce gène augmente la remobilisation d'azote et conduit à une meilleure allocation de cet élément vers les grains (Waters et al., 2009). L'allèle favorable de ce gène n'a d'abord pas été considéré comme présent chez le blé tendre (Uauy et al., 2006) mais il a finalement été identifié dans des variétés anciennes de blés hexaploïdes (Asplund et al., 2010).

Chez l'orge, Jukanti and Fischer (2008) ont détecté un QTL sur le chromosome 6H associé à une accélération de la sénescence et à une augmentation de la teneur en protéines. Il a été proposé que ce QTL soit un orthologue de *GPC-B1* (Distelfeld et al., 2008). Par la suite, il a été montré que ce QTL n'est pas seulement associé à une accélération de la sénescence durant le remplissage du grain mais aussi à une accélération du rythme de développement bien avant floraison (Lacerenza et al., 2010).

Ces études mettent en avant la remobilisation d'azote et l'efficacité de remobilisation comme des caractères pouvant potentiellement expliquer le GPD. Elles montrent aussi l'existence d'un possible lien entre le rythme de développement, la cinétique de sénescence durant le remplissage du grain et la teneur en protéines.

7.1.2 L'absorption d'azote durant la période post-floraison

La variabilité génétique pour l'absorption d'azote post-floraison pourrait également expliquer la variabilité génétique pour le GPD. Cette composante de la quantité d'azote total à maturité peut représenter jusqu'à 40% de l'azote du grain chez le blé d'hiver (Sanford and MacKown, 1986; Kichey et al., 2007) soit environ 10 à 80 kg d'azote par hectare. Dans des conditions agro-climatiques favorables à l'absorption d'azote post-floraison, comme celles rencontrées au Nord-Ouest de l'Europe, un pool important d'azote est disponible durant la période de remplissage du grain et pourrait être suffisant pour expliquer une part significative du GPD. Là encore, la cinétique de sénescence pourrait être reliée à la capacité d'absorption d'azote durant le remplissage du grain. En effet, il a été proposé que les phénotypes "stay-green"² de sorgho (*Sorghum bicolor*) résultent d'un maintien de l'absorption d'azote durant le remplissage des grains (Borrell et al., 2001). Selon cette hypothèse, la prolongation de l'activité photosynthétique, en maintenant l'activité racinaire, permet de prolonger l'absorption d'azote durant la période post-floraison.

2. Qui maintiennent leur surface foliaire verte et active après floraison

Troisième partie

Objectifs et stratégie de recherche

Chapitre 8

Le projet “NUE traits”

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet “NUE traits”¹ co-financé par l’INRA² et le BBSRC³ pour la période 2007-2010. Ce projet fédère différentes équipes de l’INRA, du John Innes Center, de l’université de Nottingham et de Rothamsted Research. L’objectif principal du projet consiste à identifier des caractères et les régions chromosomiques associées permettant d’améliorer l’efficacité d’utilisation de l’azote et la teneur en protéines du grain chez le blé tendre d’hiver.

Ce projet comprend différents volets (WP ; “Work Package”) dont les objectifs spécifiques sont :

1. WP1 : Rechercher des caractères liés à l’allocation de l’azote à floraison entre les différents organes ou entre les différentes couches foliaires de la canopée, associés à une augmentation de la NUE, à une augmentation ou une meilleure stabilité de la teneur en protéines et évaluer la variabilité génétique existante pour ces caractères.
2. WP2 : Identifier des QTL associés à la NUE et à la teneur en protéines sur des populations de lignées haploïdes-doublées obtenues après croisement de génotypes contrastés pour la NUE et la teneur en protéines.
3. WP3 : Identifier des lignées au sein de populations de mutants pour la cinétique de sénescence, la NUE et la teneur en protéines puis rechercher des gènes candidats pour la cinétique de sénescence, la NUE et la teneur en protéines à partir de ces mutants.
4. WP4 : Evaluer la stabilité des QTL identifiés pour la NUE ou la teneur en protéines en utilisant le modèle de culture de blé *SiriusQuality*.

Le travail réalisé au cours de la thèse s’inscrit au sein des WP2 et WP3. Le travail réalisé au sein du WP3 sur la population de mutants de la variété Renan a consisté à sélectionner des lignées sur la base d’un phénotypage de la durée de sénescence des feuilles durant la période post-floraison effectué trois années consécutives au champ. Ce travail n’a pas fait l’objet de publication et ne sera pas présenté dans ce manuscrit. En revanche, le travail effectué dans le cadre du WP2 sur les populations de cartographie ainsi qu’une étude portant sur du matériel végétal expérimenté dans le cadre d’un projet FSOV⁴ antérieur seront présentés.

1. <http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/bab/mas-projects/NUE.html>

2. Institut National de la Recherche Agronomique (<http://www.inra.fr/>)

3. UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (<http://www.bbsrc.ac.uk/>)

4. Fond de Soutien pour l’Obtention Végétale (<http://www.fsov.org/>)

Chapitre 9

Questions de recherche développées au cours de la thèse

9.1 Le GPD est-il déterminé par la remobilisation ou l'absorption d'azote post-floraison ?

Cette première étude a consisté à identifier lequel des processus parmi la remobilisation de l'azote, l'efficacité de remobilisation ou l'absorption d'azote post-floraison explique la plus forte part du GPD dans des conditions agro-climatiques représentatives du Nord-Ouest de l'Europe. Connaissant l'impact de la variabilité génétique pour la date de floraison sur de nombreux caractères agronomiques, et probablement sur le poids relatif de ces composantes dans la quantité totale d'azote absorbée à maturité, l'impact de la date de floraison sur le GPD et sa principale composante a été analysé. Enfin, sur la base des résultats obtenus, différents caractères physiologiques pouvant expliquer le GPD ont été proposés.

Le matériel végétal utilisé comprenait 27 cultivars de blé tendre inscrits au catalogue Français entre 1974 et 2004 excepté Espéria et Farandole inscrits sur la liste européenne et CF99102, une lignée sélectionnée à l'INRA présentant une forte teneur en protéines, mais non inscrite. Ces différents génotypes ont été expérimentés dans 27 environnements contrastés comprenant différents lieux, différentes années et différents traitements (azote fort / faible, irrigation, densité de semis). Le rendement en grains, la teneur en protéines et la date de floraison ont été mesurés dans l'ensemble des environnements d'étude. La quantité d'azote à floraison et à maturité, pour le calcul de l'azote remobilisé et absorbé post-floraison, ont été mesurés dans 12 environnements. Afin de décomposer le GPD et d'identifier les caractères associés, la méthode d'analyse a consisté à rechercher les corrélations permettant d'établir un lien entre ce caractère et d'autres variables. Pour cela, les coefficients de corrélation - des indicateurs statistiques jugeant de la force de l'association entre deux variables - ont été analysés.

9.2 Le GPD est-il associé à un profil de sénescence ?

Les objectifs de cette seconde étude étaient :

1. d'évaluer les corrélations phénotypiques entre la durée de sénescence des feuilles après floraison, la date de floraison, la teneur en protéines et le rendement en grains
2. d'identifier les régions chromosomiques associées à des QTL stables ou pleiotropiques pour ces différents caractères

3. de proposer des processus physiologiques potentiellement responsables des corrélations observées entre la durée de sénescence des feuilles au cours du remplissage des grains et la teneur en protéines ou le rendement en grains au niveau phénotypique.

Le matériel végétal utilisé dans cette étude était une population de lignées haploïdes-doublées issue du croisement entre Toisonдор (inscrit en 2003 par “GAE semences”) et CF9107 (une lignée sélectionnée à l’INRA de Clermont-Ferrand mais non-inscrite au catalogue officiel). Cette population a été expérimentée au sein d’un réseau comprenant quatre lieux en France et au Royaume-Uni, durant deux années et sous deux conditions contrastées de fertilisation azotée. Le rendement en grains, la teneur en protéines et la date de floraison ont été mesurés dans chacun des environnements. L’azote totale à maturité et ses composantes (azote remobilisé et azote absorbé post-floraison) ont été mesurés dans cinq environnements. La cinétique de sénescence des feuilles durant la période post-floraison a été mesurée visuellement et ajustée selon une équation la décrivant comme un processus en deux phases. Les durées de chacune des phases ont été calculées et utilisées, ainsi que les autres caractères mesurés, pour la détection de QTL. Les colocalisations de QTL pour les durées de sénescence et le rendement en grains ou la teneur en protéines ont été recherchées et le sens de variation des effets alléliques de ces QTL pour ces différents caractères ont été analysés.

L’approche méthodologique a donc consisté à rechercher des régions chromosomiques associées à des QTL responsables des variations observées pour chacun des caractères. L’utilisation de marqueurs afin d’étudier et de cartographier les QTL est largement établie. Sax (1923) a été le premier à utiliser cette approche dans une étude de la taille des grains de *Phaseolus vulgaris* en analysant les ratios de ségrégation de marqueurs morphologiques (pigmentation des grains) et de la taille des grains dans des populations F₂ issues de différents croisements. Néanmoins, les marqueurs morphologiques présentant des inconvénients (peu polymorphes, dépendants du milieu), c’est avec le développement des marqueurs génétiques et de techniques statistiques appropriées que la cartographie de QTL a pu se développer (Kearsey and Farquhar, 1998). La première détection de QTL est attribuée à Paterson et al. (1988) et la possibilité d’utiliser en amélioration variétale les marqueurs génétiques liés à des QTL déterminant des caractères agronomiques d’intérêt est apparue dans la foulée (Tanksley et al., 1989).

Pour cette étude, des marqueurs SSR (“Single Sequence Repeat”), DArT® et SNP ont été utilisés. Les marqueurs DArT® développés par la société “Diversity Array Technology Pty Ltd” (<http://www.diversityarrays.com/>) associent à la fois les techniques de restriction et de PCR. Ces marqueurs “haut débit” permettent de cartographier plusieurs centaines de marqueurs à la fois (Akbari et al., 2006). Ils présentent néanmoins quelques inconvénients notamment un fort clustering et un faible nombre de marqueurs sur le génome D (Franki et al., 2009). Afin de palier à la faible couverture du génome D, des marqueurs SSR ont également été typés. Enfin, le développement d’une puce Illumina (Illumina Inc., <http://www.illumina.com/>) au sein de l’unité GDEC¹ de l’INRA de Clermont-Ferrand a permis d’enrichir la carte génétique à l’aide de marqueurs SNP encore non publiés.

Après la détection de QTL, une analyse des colocalisations de QTL a été réalisée. Ce type d’analyse permet d’une part de mettre en évidence des QTL “stables” (*i.e.* détectés sous différentes conditions expérimentales) et des QTL pleiotropes d’autre part (*i.e.* affectant différents caractères simultanément pour une condition expérimentale donnée), bien que pour ces derniers, la résolution obtenue par ce type d’analyse ne permette généralement pas de distinguer de véritables QTL pleiotropes de QTL fortement liés génétiquement. Afin

1. Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales (<http://www1.clermont.inra.fr/umr1095/index.php>)

d'identifier des QTL stables pour un caractère donné, les QTL détectés pour ce caractère dans différents environnements sont projetés sur la carte génétique tandis que pour identifier les QTL pleiotropes, se sont l'ensemble des QTL identifiés pour différents caractères dans un environnement donné qui sont projetés.

Une analyse hiérarchique a ensuite été conduite afin de grouper les différents QTL en méta-QTL. Ce type d'analyse peut être réalisé à l'aide des logiciels "Biomeqator" (Arcade et al., 2004) ou "MetaQTL" (Veyrieras et al., 2007) développés à l'INRA. Ces logiciels permettent de réaliser une méta-analyse selon la théorie développée par Goffinet and Gerber (2000). Cette méthode est suffisamment robuste pour être appliquée sur un jeu de données non indépendantes (*i.e.* pour des données collectées sur une même population de cartographie expérimentée dans différents environnements, comme c'est le cas dans la présente étude). La procédure consiste à choisir le meilleur modèle parmi les k modèles possibles ($k = 1, \dots, n$) décrivant le nombre de méta-QTL présents sur un groupe de liaison donné. Cette méthode a d'abord été appliquée pour l'étude de la précocité du maïs (Chardon et al., 2004), du déterminisme génétique de la NUE sous des conditions de nutrition azotée contrastées (Laperche et al., 2007), de la date de floraison chez le blé (Hanocq et al., 2007; Griffiths et al., 2009) et de la résistance à la sécheresse chez le riz (Khowaja et al., 2009).

9.3 Quelles régions chromosomiques permettent d'augmenter la teneur en protéines indépendamment du rendement en grains ?

L'objectif de cette étude consistait à rechercher des régions chromosomiques et les marqueurs génétiques associés affectant la teneur en protéines indépendamment du rendement en grains potentiellement utiles en amélioration variétale. Le matériel végétal utilisé pour cette étude était constitué de trois populations de lignée haploïdes-doublées connectées selon un plan de croisement de type demi-diallèle (Figure 9.1 p.64).

Les parents de ces différentes populations ont été choisis *a priori* sur la base de leur GPD moyen (CF9107 et Québon : GPD positif, Toisonдор : GPD nul). Ces trois populations ont été expérimentées au sein d'un réseau expérimental comprenant sept combinaisons lieu $\times$ année $\times$ traitement azoté. Le rendement en grains et la teneur en protéines ont été mesurés pour l'ensemble de ces populations, ainsi que la date de floraison pour la population TOR107 dans tous les environnements et pour les deux autres populations dans deux environnements. L'approche a consisté à rechercher des QTL pour le rendement en grains, le GPD, la teneur en protéines et la date de floraison pour chaque combinaison population $\times$ environnement. Ces QTL ont ensuite été projetés sur une carte génétique consensus puis leurs colocalisations ont été analysées afin d'identifier les marqueurs génétiques associés à des QTL de GPD ou de teneur en protéines mais pas à des QTL de rendement en grains.

L'utilisation en sélection de telles régions suppose qu'elles aient plusieurs caractéristiques (Gupta et al., 1999; Dubcovsky, 2004), une certaine stabilité environnementale (*i.e.* que ces régions aient été identifiées dans des conditions expérimentales variées), un effet indépendant du fond génétique et une liaison forte avec le gène sous-jacent. Les deux premiers critères ont donc été utilisés pour hiérarchiser les régions identifiées. Au vu de la résolution de ce type d'analyse, il n'est pas envisageable d'identifier un marqueur "parfait" (*i.e.* totalement lié au gène) et une étape de cartographie fine des QTL est nécessaire pour répondre au troisième critère.

Ce type d'étude a déjà été effectué sur des populations biparentales mais souvent le

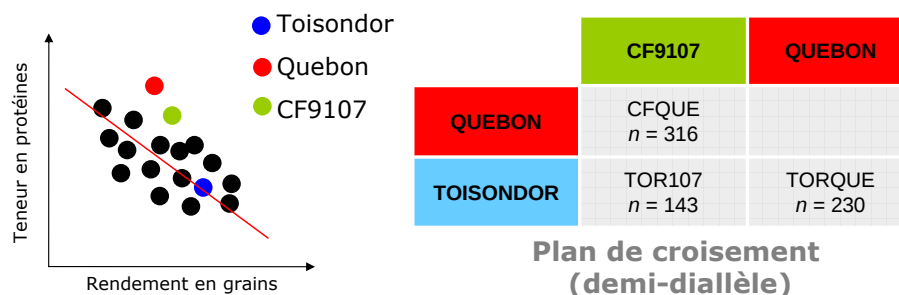


FIGURE 9.1 – Plan de croisement de type demi-diallèle pour l’obtention de trois populations de lignées haploïdes-doublées à partir des parents CF9107, QUEBON et TOISONDOR. Les parents ont été choisis *a priori* sur la base du signe de leur écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains (positif pour CF9107 et QUEBON, nul pour TOISONDOR). Le nom des populations ainsi que le nombre de descendants de chaque croisement (n) sont indiqués.

rendement en grains n’était pas pris en compte ou était mal estimé (Joppa et al., 1997; Zanetti et al., 2001; Prasad et al., 1999, 2003; Blanco et al., 2002; Charmet et al., 2005). D’autre part, quand le rendement était mesuré, des QTL de rendement en grains étaient généralement associés à des QTL de teneurs en protéines avec des effets inverses, contribuant ainsi à la relation négative teneur en protéines - rendement en grains (Blanco et al., 2002; Charmet et al., 2005). L’originalité de notre approche tiens donc dans le fait que d’une part cette étude combine la détection de QTL à la fois pour le rendement en grains et la teneur en protéines, que c’est la première étude utilisant le GPD en détection de QTL, et d’autre part qu’elle soit réalisée sur plusieurs populations permettant ainsi de prendre en compte un éventuel effet du fond génétique.

Quatrième partie

Étude des bases écophysiologiques du GPD

Ce premier article publié dans “*Journal of Experimental Botany*” présente des résultats obtenus sur 27 cultivars de blé tendre expérimentés dans 27 environnements reflétant une large gamme de conditions pédoclimatiques représentatives des conditions culturales dans le Nord-Ouest de l’Europe. Dans cet article, il est clairement mis en évidence que :

1. parmi les composantes de l’azote total à maturité, c’est l’azote absorbé durant la période post-floraison qui contribue majoritairement au GPD.
2. plus particulièrement, il est montré que c’est la variabilité génétique pour la quantité d’azote absorbée post-floraison indépendamment de la quantité d’azote à floraison qui explique largement le GPD.

Différentes hypothèses sont proposées quant aux mécanismes physiologiques potentiellement impliqués dans le déterminisme de l’absorption d’azote post-floraison. Ainsi, la variabilité génétique pour le maintien de l’activité racinaire par un prolongement de la durée de vie du couvert (sénescence retardée) ou la résistance aux stress, la variabilité génétique pour l’accès à l’azote du sol à travers l’architecture racinaire ou la variabilité génétique dans la réponse des gènes induits par les signaux internes reflétant le statut azoté (gènes de transport et d’assimilation de l’azote) pourraient expliquer le GPD (Figure 9.2 p. 67).

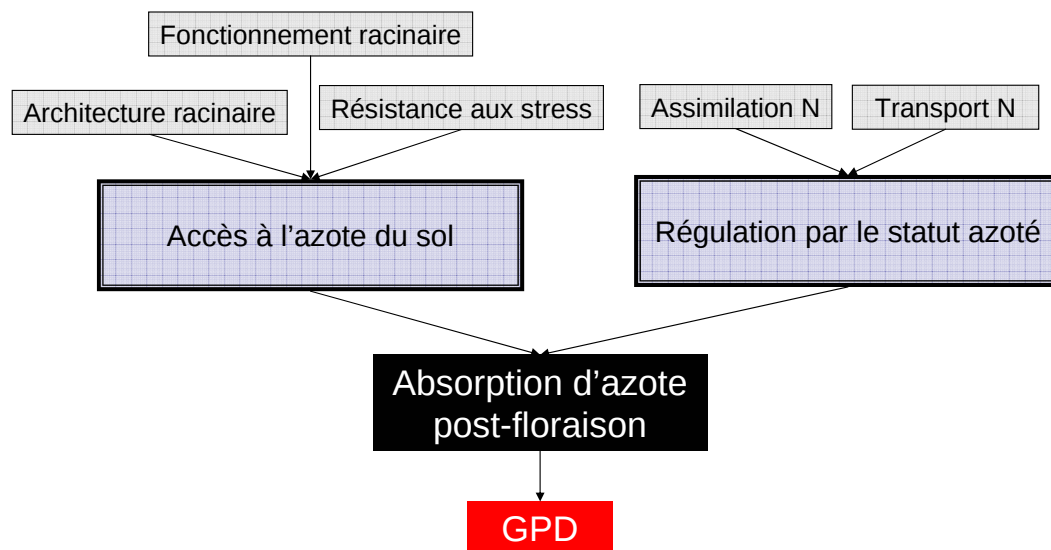


FIGURE 9.2 – Processus physiologiques susceptibles d’affecter l’absorption d’azote post-floraison et *in fine* le GPD chez le blé. La variabilité génétique pour des caractères physiologiques affectant l’accès à l’azote du sol (fonctionnement, architecture racinaire, résistance au stress) ou la régulation de l’absorption d’azote par le statut azoté (assimilation, transport d’azote) sont susceptibles d’affecter le GPD. Ces processus ne sont pas *a priori* exclusifs. D’après [Bogard et al. \(2010\)](#)

Chapitre 10

Deviation from the grain protein concentration - grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat.

Running title :

Grain protein deviation and post-anthesis N uptake.

Authors :

Matthieu Bogard^{1,2}, Vincent Allard^{1,2}, Maryse Brancourt-Hulmel³, Emmanuel Heumez³, Jean-Marie Machet⁴, Marie-Hélène Jeuffroy⁵, Philippe Gate⁶, Pierre Martre^{1,2}, Jacques Le Gouis^{1,2,*}

¹ INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 234 Avenue du Brézet, F-63 100 Clermont-Ferrand, France

² Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, F-63 177 Aubière Cedex, France

³ INRA, UMR 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés, Estrées-Mons, F-80 203 Péronne, France

⁴ INRA - Agro-Impact, F-02007 Laon, France

⁵ INRA, UMR 211 Agronomie, INRA/AgroParisTech, F-78 850 Thiverval-Grignon, France

⁶ Arvalis-Institut du Végétal, Station de la Minière, F-78850 Guyancourt, France

* **Corresponding author** : Jacques Le Gouis
Email : Jacques.Legouis@clermont.inra.fr

Address : INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales. 234 Avenue du Brézet, F-63 100 Clermont-Ferrand, France

Phone : +33 4 73 62 43 11

Fax : +33 4 73 62 44 53

Date of submission : 20/04/2010

Number of figures : 3

Number of Tables : 4

Abbreviations :

GPC, grain protein concentration; GPD, grain protein deviation; $G \times E$, genotype by environment; GY, grain yield; QTL, Quantitative Trait Loci.

10.1 Abstract

In plants, carbon and nitrogen economies are intimately linked at the physiological and biochemical level. The strong genetic negative correlation between grain yield and grain protein concentration observed in various cereals is an illustration of this interrelationship. Studies have shown that deviation to this negative relationship (Grain Protein Deviation or GPD) has a genetic basis, but its physiological basis is still poorly understood. This study analysed data on 27 genotypes grown in multi-environment field trials, representing a wide range of agricultural practices and climatic conditions. The objective was to identify physiological processes related to the genetic variability in GPD. Under most environments, GPD was significantly related to post-anthesis N uptake independently of anthesis date and total N at anthesis. The underlying physiological trait might be related to genotypic differences either in access to soil N, regulation of N uptake by plant N status or ability to maintain root activity during the grain-filling period. GPD is an interesting potential target in breeding as it appears to be relatively robust across different environments and would be valuable in increasing total N uptake by maturity.

Keywords :

Grain protein concentration, grain protein deviation, grain yield, nitrogen remobilization, post-anthesis nitrogen uptake, *Triticum aestivum* L.

10.2 Introduction

Grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) are two major targets in wheat breeding programmes as the former determines crop productivity and the latter is a major determinant of wheat end-use value and baking quality (Branlard et al., 2001; Oury et al., 2010). These two traits have been difficult to improve simultaneously due to the negative genetic relationship between GPC and GY (Slafer et al., 1990; Simmonds, 1995) that exists in various cereals (Feil, 1997).

This negative relationship illustrates the interrelationship between Carbon and N metabolism (Lam et al., 1996) at the canopy level. It has been shown to have a strong genetic origin that is sometimes masked due to large genotype by environment ($G \times E$) interactions (Oury et al., 2003). Two main hypotheses have been postulated to explain the physiological basis

of this negative correlation : competition between carbon and N for energy (Munier-jolain and Salon, 2005) and an N dilution effect by carbon-based compounds (Acreche and Slafer, 2009).

A way to counteract this negative correlation is to alter agronomical practices. Delaying the last fertilizer application to around heading has been shown to increase GPC without any reduction in GY. However, this approach is risky in that its success is highly dependent on suitable climatic conditions, in particular water availability during the post-anthesis period, and so often marginal N uptake is less efficient leading to multiple environmental consequences.

Different strategies in the field of breeding have been proposed to shift this negative relationship such as targeting grain N yield or GPC above a threshold of GY (Monaghan et al., 2001), the use of selection index (Iqbal et al., 2007) or the introgression of high GPC genes from related species (Mesfin et al., 1999). So far, none of these have been successful.

Monaghan et al. (2001) suggested deviation from the regression line between GY and GPC (“*grain protein deviation*”; GPD) could be used to identify genotypes having higher GPC than would be expected from their GY. Oury and Godin (2007) described how to assess GPD in terms of calculation and experimental design but its physiological bases remain poorly understood although it appears as an interesting trait to study the genetic variability existing on physiological mechanisms controlling the interrelationship between carbon and N metabolism. While little is known about the physiology behind GPD, some studies offer insights into potential traits affecting GY and GPC (*i.e.* carbon and N metabolism) separately. In particular, it is known that GPC is more related to total N uptake than GY (Dupont and Altenbach, 2003). This may indicate that physiological mechanisms responsible for greater uptake and/or remobilization of N could affect differentially the N and carbon metabolisms.

Uauy et al. (2006) cloned from a *Triticum turgidum* ssp. *durum* × *Triticum turgidum* ssp. *diccoides* cross a NAC transcription factor, called *NAM-B1*, responsible for the *Gpc-B1* QTL on chromosome 6BS increasing GPC without reducing GY. This gene was shown to accelerate canopy senescence during grain-filling and to be responsible for a higher N remobilization and a better partitioning of N to the grain (Waters et al., 2009). However, a non-functional allele of this gene has been fixed during domestication (Uauy et al., 2006). In barley (*Hordeum vulgare* L.), Jukanti and Fischer (2008) found a QTL on chromosome 6H associated to accelerated senescence and high GPC. This QTL was suggested as a potential orthologue of the wheat QTL *Gpc-B1* (Distelfeld et al., 2008). These studies raise the possibility that total N remobilization and/or N remobilization efficiency explain the physiology of GPD.

However, post-anthesis N uptake might also be involved even though it generally accounts for only 5% to 40% of total grain N in winter wheat (Sanford and MacKown, 1986; Kichey et al., 2007). Under favourable climatic conditions, such as those in northern Europe, a large N pool may be available to the crop during the grain-filling period so could be sufficient to explain a significant part of GPD. In this respect, Monaghan et al. (2001) already identified post-anthesis N uptake as an important component of GPD using multiple step wise regression. However, the restricted number of genotypes and agro-climatic conditions represented in their dataset reduce the scope of their finding and the possibility to generalize.

The objective of this study was to identify the main processes that determine GPD. To study such an integrative trait derived from GPC and GY both prone to G × E interactions, a dataset reflecting a large agro-climatic variability is needed so physiological traits consistently related to GPD can be identified. Data were obtained for 27 European winter wheat cultivars grown in 27 environments representing a wide range of agricultural practices and climatic

conditions. Phenotypic correlations were analysed environment by environment to identify physiological processes significantly associated to GPD while taking into account putative environment-specific relationships. Results showed that GPD is consistently explained by post-anthesis N uptake independently of anthesis date and total N at anthesis.

10.3 Materials and methods

10.3.1 Trials

Field trials were carried out over two consecutive growing seasons, 2003-2004 and 2004-2005, in seven locations in northern France : Estrées-Mons (Ms; 49°08' N, 03°00' E, 85 m a.s.l), Le Moulon (Ml; 48°42' N, 02°08' E, 156 m a.s.l), Momont Allonnes (Mm; 48°19' N, 01°39' E, 139 m a.s.l), Ouzouer-le-Marché (Ar; 47°54' N, 01°31' E, 127 m a.s.l), Maisse (Ga; 48°23' N, 02°22' E, 110 m a.s.l), Estrées-Saint-Denis (Sa; 49°25' N, 02°38' E, 70 m a.s.l) and Auchy-lez-Orchies (Le; 50°28' N, 03°12' E, 50 m a.s.l).

Four different treatments were applied depending on the location and year : possible N treatment according to local practice (+N, 11 site $\times$ season combinations), low N treatment (-N, 7 site $\times$ season combinations), high N treatment (+HN, 1 site $\times$ season combination) and low density treatment (-D, 8 site $\times$ season combinations). This gave a total of 27 combinations of year $\times$ location $\times$ treatment, which are henceforward referred to as different environments identified by the harvest year (04 or 05), the location (Ar, Ga, Ml, Mm, Ms, Le or Sa) and the treatment applied (-N, +HN, +N, or -D). Two environments with +N treatments in Mons in 2004 differing in terms of the preceding crop are named 04Ms+N1 and 04Ms+N2 where oat (*Avena sativa* L.) or maize (*Zea mays* L.) were the preceding crops, respectively. More details of the environments and the treatments applied are given in Table 10.1 p. 73 and Zheng et al. (2009). For each environment, a randomized complete block design with two (site Ar) or three replicates (elsewhere) was used. When necessary, fungicides, insecticides and herbicides were applied to achieve optimal management of the crop.

Twenty-seven cultivars were tested (Table 10.2 p. 74) that were all registered in France between 1974 and 2004, except for Espéria and Farandole on the European list and CF99102, an INRA breeding line. These 27 cultivars were grown in all trials except for 04Ar-N, 04Ar-D and 04Ar+N where only 21 cultivars were tested (Apache, Equilibre, Espéria, Grisby, Isidor and Quebon were omitted) and 04Ga+N where only 25 cultivars were tested (Caphorn and Parador were omitted).

TABLE 10.1 – Summary of environments characteristics : environment abbreviations, harvest year, location, treatment, sowing date, preceding crop, soil N at the end of winter, total N applied and plant density. Treatments were as follow : possible N (+N), low density (-D), low N (-N), high N (+HN). See [Zheng et al. \(2009\)](#) for additional informations.

Environment	Harvest year	Location	Treatment	Sowing date	Preceding crop	Soil N (kg N ha ⁻¹)	N applied (kg N ha ⁻¹)	Density (plants m ⁻²)
04Ar+N	2004	Ar	+N	17 Oct. 2003	Pea	82	180	250
04Ar-D	2004	Ar	-D	17 Oct. 2003	Pea	82	100	100
04Ar-N	2004	Ar	-N	17 Oct. 2003	Pea	82	60	250
04Ga+N	2004	Ga	+N	17 Oct. 2003	Rapeseed	87	200	290
04Ml+N	2004	Ml	+N	27 Oct. 2003	Oat	39	174	220
04Ml-D	2004	Ml	-D	27 Oct. 2003	Oat	39	120	90
04Ml-N	2004	Ml	-N	27 Oct. 2003	Oat	39	60	220
04Mm+N	2004	Mm	+N	25 Oct. 2003	Pea	77	180	240
04Mm-D	2004	Mm	-D	25 Oct. 2003	Pea	63	120	100
04Ms+N2	2004	Ms	+N	17 Oct. 2003	Maize	203	65	240
04Ms+N1	2004	Ms	+N	14 Oct. 2003	Oat	45	210	240
04Ms-D	2004	Ms	-D	14 Oct. 2003	Oat	45	150	100
04Ms-N	2004	Ms	-N	14 Oct. 2003	Oat	45	110	240
05Ar+N	2005	Ar	+N	13 Oct. 2004	Rapeseed	84	190	250
05Ar-D	2005	Ar	-D	13 Oct. 2004	Rapeseed	84	150	100
05Ar-N	2005	Ar	-N	13 Oct. 2004	Rapeseed	84	80	250
05Le+N	2005	Le	+N	20 Oct. 2004	French bean	117	210	250
05Ml+N	2005	Ml	+N	26 Oct. 2004	Oat	49	180	220
05Ml-D	2005	Ml	-D	26 Oct. 2004	Oat	49	120	90
05Ml-N	2005	Ml	-N	26 Oct. 2004	Oat	49	80	240
05Ms+HN	2005	Ms	+HN	25 Oct. 2004	Oat	45	250	240
05Ms+N	2005	Ms	+N	25 Oct. 2004	Oat	45	200	240
05Ms-D	2005	Ms	-D	25 Oct. 2004	Oat	45	150	100
05Ms-N	2005	Ms	-N	25 Oct. 2004	Oat	45	100	240
05Sa+N	2005	Sa	+N	13 Oct. 2004	Potato	47	180	270
05Sa-D	2005	Sa	-D	13 Oct. 2004	Potato	47	180	110
05Sa-N	2005	Sa	-N	13 Oct. 2004	Potato	47	120	270

TABLE 10.2 – Mean grain yield (GY), grain protein concentration (GPC), grain protein deviation (GPD), grain N deviation (GND), ratio of grain N deviation on total grain N (pGND), post-anthesis N uptake (PANU), N remobilization (NREM) and N remobilisation efficiency (NRE) of the 27 wheat genotypes. Genotypes are ranked in decreasing order of mean grain yield. Maximum, minimum, mean values and least significant difference ($\alpha = 0.05$) are given.

Cultivar	abbreviation	GY (g m ⁻²)	GPC (%)	GPD (%)	GND	pGND (%)	PANU (g N m ⁻²)	NREM (g N m ⁻²)	NRE (%)
EQUILIBRE	EQU	822	10.38	-0.30	-0.44	2.9	2.7	11.6	77
ORVANTIS	ORV	815	10.68	-0.14	-0.20	1.3	2.2	11.7	77
VIVANT	VIV	810	10.35	-0.47	-0.67	4.6	1.1	12.4	77
ISENGRAIN	ISE	809	10.84	-0.04	-0.06	0.4	2.5	12.0	79
CHARGER	CHA	801	10.16	-0.78	-1.10	7.7	1.4	11.8	78
ORNICAR	ORN	798	11.09	0.12	0.17	1.1	2.2	12.4	77
GRISBY	GRI	797	11.08	0.20	0.27	1.8	1.6	13.1	79
FARANDOLE	FAR	789	11.19	0.17	0.24	1.5	2.2	12.3	79
NIRVANA	NIR	788	11.29	0.21	0.29	1.9	3.4	11.6	76
QUEBON	QUE	785	11.54	0.51	0.71	4.5	2.7	12.2	76
APACHE	APA	785	10.79	-0.18	-0.25	1.7	1.7	12.6	79
CAPHORN	CAP	781	11.07	-0.01	-0.01	0.1	2.4	12.1	79
CEZANNE	CEZ	777	10.86	-0.33	-0.45	3.1	1.9	11.5	80
ARCHE	ARC	775	10.36	-0.80	-1.08	7.7	1.3	12.0	76
RITMO	RIT	774	10.52	-0.56	-0.76	5.3	1.5	11.8	76
PARADOR	PAR	770	10.55	-0.56	-0.75	5.3	1.2	12.0	78
TILBURI	TIL	768	10.83	-0.35	-0.48	3.3	1.5	12.0	78
CF99102	CF9	760	12.28	0.94	1.25	7.7	3.2	12.4	79
ISIDOR	ISI	753	11.57	0.14	0.18	1.2	2.4	12.0	80
AZTEC	AZT	751	10.94	-0.50	-0.66	4.6	2.4	11.1	77
SOISSONS	SOI	750	11.86	0.40	0.53	3.4	2.7	12.3	78
PERNEL	PER	730	11.37	-0.22	-0.29	2.0	1.9	12.0	78
RECITAL	REC	711	11.25	-0.40	-0.50	3.6	3.4	10.3	78
EUREKA	EUR	709	11.91	0.10	0.12	0.8	2.3	11.9	77
RENAN	REN	682	12.78	0.81	0.97	6.4	2.3	12.5	76
COURTOT	COU	615	13.98	1.23	1.33	8.8	3.2	11.4	77
ESPERIA	ESP	600	13.71	0.96	1.01	7.0	3.5	10.6	80
min	-	600	10.16	-0.80	-1.10	0.1	1.1	10.3	76
max	-	822	13.98	1.23	1.33	8.8	3.5	13.1	80
mean	-	759	11.30	0.01	-0.02	3.7	2.3	11.9	78
LSD	-	32	0.42	0.43	0.57	2.9	1.2	1.1	2

10.3.2 Plant sampling and measurements

Anthesis date was recorded as the day of the year when 50% of the spikes carried visible stamens. All trial plots were harvested with a combine harvester. Grain yield (GY) was estimated on the basis of a 15% moisture content. In Mons for all treatments and in Le Moulon for the +N and -N treatments, samples were cut at ground level at anthesis to estimate above-ground biomass. The areas of the samples were 1.2 m² for all three replicates in Mons and 0.4 m² for two replicates in Le Moulon. In the same trials, about 120 shoots were randomly collected at harvest in order to estimate the harvest index by separating grain from the remaining above-ground biomass. Total above-ground biomass was estimated by dividing combined grain yield by harvest index. Total N at anthesis and straw N at harvest were estimated using a near-infrared reflectance spectroscopy analyser (NIRS, Technicon Infra-Analyser 400, Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, New-York, USA) calibrated with samples the total N concentration of which was determined by the Dumas method (AOAC method n° 7-024).

NIRS was used to assess GPC of whole grain from all plots except in Ouzouer-le-Marché and Maise where only one replicate was used. Grain N concentration was then calculated as the GPC divided by 5.7 (Sosulski and Imafidon, 1990). Post-anthesis N uptake was estimated as total N at harvest minus total N at anthesis. N remobilization to the grain was calculated as total N at anthesis minus straw N at maturity. N remobilization efficiency was calculated as N remobilization divided by total N at anthesis. All values were adjusted to 0% moisture content.

10.3.3 Statistical analysis

The GPC - GY relationship and its residuals (GPD) were calculated for each block in each environment. Genotypic GPD values were then obtained for each environment, treatment and site $\times$ season combination by averaging GPD values. Grain N deviation was defined as the quantity of N accounted for by GPD calculated as GPD multiplied by GY. Its contribution to grain N content was calculated as grain N deviation / grain N content $\times$ 100. Correlations between traits were assessed using Pearson's correlation coefficients. Genotypic and environment effect and G $\times$ E interaction were tested by analysis of variance. All the statistical analysis and the graphics were performed using R v2.6.2 (R Development Core Team, 2008).

10.4 Results

10.4.1 The negative grain protein concentration - grain yield relationship and grain protein deviation across environments and genotypes

Field trials of 27 genotypes of wheat in 27 different agronomical environments were carried out in France to gather data on GPD and potentially related physiological characteristics. Grain harvested from the 27 environments was highly variable, the mean GY ranging from 500 to 894 g m⁻² and the mean GPC from 7.2% to 13.4% (Table 10.3 p. 77). Mean genotypic values for GY and GPC also showed a large genetic variability as GY ranged from 600 to 822 g m⁻² and from 10.2% to 14 % respectively (Table 10.2 p. 74). This wide variability can

be attributed both to the diversity of the genetic material used and to the diversity of the environments tested accentuated by the different N treatments.

A highly significant negative correlation was observed between mean GY and GPC with a slope of $-0.015 \text{ \% g}^{-1} \text{ m}^2$, GY variability accounting for 78% of GPC variability (Fig. 10.1 p. 76). When each environment is considered separately, the negative correlation is generally weaker but still significant except in the case of 05Sa+N (Table 10.3 p. 77). On average the variation in GY accounts for about 50% of the variation in GPC, the coefficient of determination ranging from 0.10 to 0.85 (Table 10.3 p. 77). The slope of the regression is negative in all cases, with a mean value of $-0.0112 \text{ \% g}^{-1} \text{ m}^2$ meaning that on average an increase of 100 g m^{-2} of GY corresponds to a decrease in GPC of about 1 point.

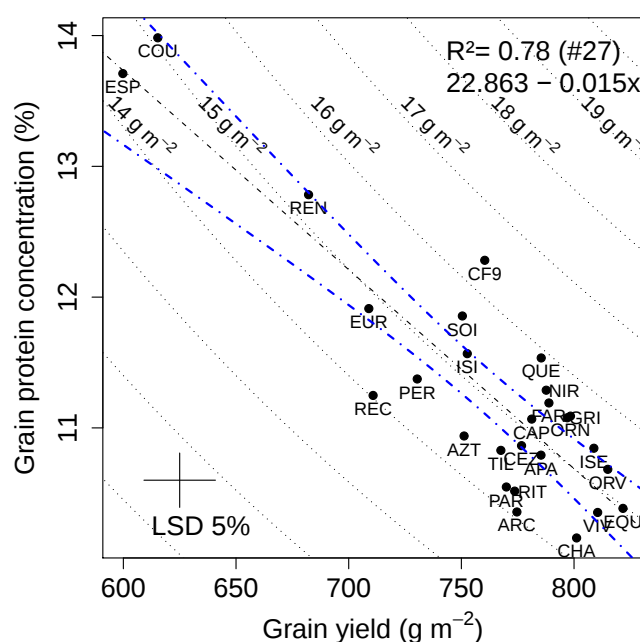


FIGURE 10.1 – Relationship between grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC). Data are means for 27 cultivars grown in 27 different environments. The solid line is the fitted linear regression of GPC on GY values ($\text{GPC} = 22.863 - 0.015 \times \text{GY}$, $R^2 = 0.78$, $n = 27$, $p\text{-value} \leq 0.001$). Dotted lines are iso-grain N yield. Dot-dashed lines represent the 95% estimation confidence interval. Genotypes are identified using the first three letters of their names (see Table 10.2 p. 74 for full names).

Grain protein deviation (GPD) was calculated for each genotype in each environment. The mean genotypic GPD ranged from 1.23% for Courtôt to -0.80% for Arche (Table 10.2 p. 74). To illustrate what GPD represents in terms of N uptake and translocation to the grain, the N amount represented by GPD was calculated (grain N deviation). Grain N deviation ranged from -1.10 g N m^{-2} for Charger to 1.33 g N m^{-2} for Courtôt (Table 10.2 p. 74). The proportion of grain N accounted for by GPD ranged from 0.1% for Caphorn to 8.8% for Courtôt with a mean value of 3.7%. This shows that GPD represents a small proportion of total grain N. Analysis of variance for GPD showed significant genotypic differences and $G \times E$ interactions (data not shown).

Genotypic GPD values were calculated for the +N, -N and -D treatments. Highly signi-

ficant correlations were obtained between GPD measured for each treatment : 0.92 between +N and -N, 0.94 between +N and -D, and 0.92 between -D and -N. These correlations were stronger than those calculated between site $\times$ season combinations, which ranged from 0.26 to 0.86. Correlations between site $\times$ seasons combinations were significant in 43 out of 45 combinations (data not shown). This shows that despite significant $G \times E$ interactions, GPD appears relatively stable across the environments studied and across treatments in particular.

TABLE 10.3 – Mean grain yield (GY), mean grain protein concentration (GPC), slope (b) and coefficient of determination (R^2) of the linear regression between GPC and GY, post-anthesis N uptake (PANU), N remobilization (NREM) and N remobilization efficiency (NRE) for the 27 environments. Environments are ranked in decreasing order of GY. Environments abbreviations are given in Table 10.1 p. 73. Maximum, minimum, mean values and least significant difference ($\alpha = 0.05$) are given.

Environment	GY (g m ⁻²)	GPC (%)	b ($\times 10^{-2}\%$ g ⁻¹ m ²)	R ²	PANU (g N m ⁻²)	NREM (g N m ⁻²)	NRE (%)
04Ms+N1	894	12.48	-1.40	0.74	6.2	13.3	78
04Mm+N	893	10.99	-0.65	0.47	-	-	-
04Ms+N2	883	12.60	-0.97	0.37	4.8	14.6	68
05Sa-D	861	13.32	-0.57	0.16	-	-	-
05Sa+N	861	13.06	-0.40	0.10	-	-	-
04Ga+N	850	12.20	-0.79	0.35	-	-	-
05Sa-N	849	10.93	-0.65	0.23	-	-	-
04Ml+N	822	11.05	-1.17	0.74	-1.0	16.2	82
04Ar+N	818	12.75	-0.72	0.46	-	-	-
05Ml+N	806	11.34	-1.55	0.77	2.5	13.4	80
05Ms+N	780	11.38	-1.36	0.41	3.5	12.0	75
04Mm-D	777	10.60	-0.58	0.32	-	-	-
05Ms+HN	775	13.03	-0.84	0.16	1.0	16.6	78
04Ml-D	765	9.55	-1.28	0.75	-	-	-
05Ml-D	763	10.36	-1.60	0.81	-	-	-
04Ar-D	760	12.30	-0.99	0.62	-	-	-
05Le+N	742	11.53	-0.56	0.14	-	-	-
05Ms-D	730	11.71	-2.05	0.57	6.0	8.9	72
04Ms-D	727	12.25	-1.41	0.51	4.9	10.7	79
04Ar-N	722	10.96	-1.02	0.47	-	-	-
05Ar+N	698	13.45	-1.33	0.64	-	-	-
05Ar-D	665	13.00	-1.51	0.69	-	-	-
05Ar-N	651	10.53	-1.26	0.73	-	-	-
05Ms-N	646	9.73	-1.74	0.48	0.9	10.0	80
05Ml-N	644	9.79	-1.64	0.85	2.3	8.6	75
04Ml-N	634	7.57	-1.03	0.47	-1.6	9.7	82
04Ms-N	500	7.18	-1.14	0.34	-2.5	8.8	85
min	500	7.18	-2.05	0.10	-2.5	8.6	68
max	894	13.45	-0.40	0.85	6.2	16.6	85
mean	760	11.32	-1.12	0.49	2.3	11.9	78
LSD	32	0.42	-	-	1.2	1.1	2

10.4.2 Post-anthesis N uptake and N remobilization

Samplings at anthesis and harvest were used to calculate post-anthesis N uptake, N remobilization and N remobilization efficiency in 12 environments. Significant genotypic and environment effects and $G \times E$ interactions were observed for these three traits (data not shown) despite the high coefficients of variation for post-anthesis N uptake and N remobilization (86% and 16% respectively ; data not shown).

Negative mean values for post-anthesis N uptake were found in three environments (Table 10.3 p. 77) that may be attributable to sampling error or N loss after anthesis. On average, grain N content at harvest was 14.2 g N m^{-2} , from which 2.3 g N m^{-2} (16%) were assimilated by the crops after anthesis. Across genotypes, post-anthesis N uptake ranged from 1.1 g N m^{-2} to 3.5 g N m^{-2} and N remobilization from 10.3 g N m^{-2} to 13.1 g N m^{-2} (Table 10.2 p. 74).

N remobilization and post-anthesis N uptake were significantly negatively correlated in the 12 environments where they could be assessed, with correlation coefficients ranging from -0.51 in 05Ms-D to -0.87 in 05Ml-N (data not shown). On average, N remobilization efficiency was 78% meaning that more than three quarters of N absorbed before anthesis was remobilized to the grain (Table 10.2 p. 74). The lowest N remobilization efficiency value was 76% and the highest 80% showing a low genotypic variability for N remobilization efficiency in this experimental panel (Table 10.2 p. 74).

10.4.3 Correlations between grain protein deviation and N nutrition related processes

Analyses of the Pearson's correlation coefficients calculated on mean values between GPD and components of total plant N at harvest (Table 10.4 p. 79) showed that mean post-anthesis N uptake, but neither mean N remobilization nor mean N remobilization efficiency, was significantly associated with mean GPD.

The same analysis was then carried out environment by environment (Table 10.4 p. 79). The relationship between GPD and post-anthesis N uptake is notable as it was significant in nine out of the 12 environments where it could be calculated, with a correlation coefficient ranging from 0.44 to 0.76. Even in 04Ml+N and 05Ml-N where the correlation is not statistically significant at the standard $\alpha = 0.05$ level, there was still a clear tendency for GPD to be determined by post-anthesis N uptake as the p-values of the correlations were 0.09 and 0.10 respectively. A significant negative association between GPD and N remobilization efficiency was only found in environment 04Ml+N (Table 10.4 p. 79). No significant relationship was found between GPD and N remobilization in any of the environments studied (Table 10.4 p. 79). These results strongly support the idea that post-anthesis N uptake has a predominant effect on GPD.

Relationships between grain protein deviation, post-anthesis N uptake, total N at anthesis and anthesis date Post-anthesis N uptake was the N nutrition related process that accounts for most of GPD. In order to identify factors related to post-anthesis N uptake and to quantify their influence on GPD, correlation coefficients between post-anthesis N uptake, GPD, total N at anthesis, and anthesis date were computed (Table 10.5 p. 85).

GPD was significantly associated with anthesis date in five out of 12 environments and showed a non significant but clear tendency to be associated with GPD in three other environments (04Ms+N2, 04MS+N1, 05Ms+HN, p-values = 0.09, 0.10 and 0.09 respectively), the correlation being negative in each case. Post-anthesis N uptake showed significant negative associations with anthesis date in eight out of 12 environments studied (r ranging

TABLE 10.4 – Phenotypic correlation coefficients calculated between grain protein deviation and N remobilization, post-anthesis N uptake or N remobilization efficiency for each of the 12 environments where all traits could be calculated. Correlation coefficients calculated on mean values obtained from these 12 environments are presented. Significant correlations are in bold ($\alpha = 0.05$). Environment abbreviations are given in Table 10.1 p. 73.

Environment	Grain protein deviation		
	Post-anthesis N uptake	N remobilization	N remobilization efficiency
04Ml-N	0.10	0.31	0.14
04Ml+N	0.34	-0.02	-0.56
04Ms-D	0.76	-0.32	-0.36
04Ms-N	0.48	-0.03	0.15
04Ms+N2	0.54	0.06	0.16
04Ms+N1	0.50	-0.05	-0.15
05Ml-N	0.33	0.11	-0.04
05Ml+N	0.68	-0.03	0.09
05Ms-D	0.74	0.17	0.09
05Ms-N	0.64	0.11	-0.32
05Ms+HN	0.44	0.24	0.01
05Ms+N	0.53	0.16	0.07
Mean	0.67	0.08	0.16

from -0.38 to -0.79) and significant positive associations in two out of the 12 environments studied ($r = 0.43$ and 0.52). After removing the effect of anthesis date on post-anthesis N uptake using the regression between the residuals of the post-anthesis N uptake - anthesis date relationship and GPD, the association between GPD and post-anthesis N uptake remained significant in seven out of 12 environments (data not shown). Thus, the association between GPD and post-anthesis N uptake appeared largely independent of anthesis date.

GPD was never significantly related to total N at anthesis, although one environment (04Ml-N) did show a tendency for them to be associated (p -value = 0.06). In all environments, post-anthesis N uptake was negatively correlated with both N remobilization (r ranging from -0.51 to -0.87, data not shown) and total N at anthesis (r ranging from -0.45 to -0.82; Table 10.5 p. 85). However, GPD was never significantly correlated with total N at anthesis or N remobilization in any of the environments studied.

Thus, the variability in post-anthesis N uptake not explained by total N at anthesis or N remobilization appears to be an important component of GPD. The slope of the linear regression between mean post-anthesis N uptake and mean total N at anthesis was significantly different from the iso-total N at harvest (slope = -1) as the 95% confidence interval of the slope was [-0.81 :-0.18] (Fig. 10.2 p. 80).

The correlation between GPD and the residuals of the post-anthesis N uptake - total N at anthesis relationship was calculated on mean values (Fig. 10.3 p. 81). On average these residuals account for 64% of GPD variability including cultivars Espéria and Courtôt which are distinct outliers. This relationship was significant in all the environments studied and 36% to 84% of GPD was accounted for by these residuals with cultivars Espéria and Courtôt as frequent outliers (data not shown).

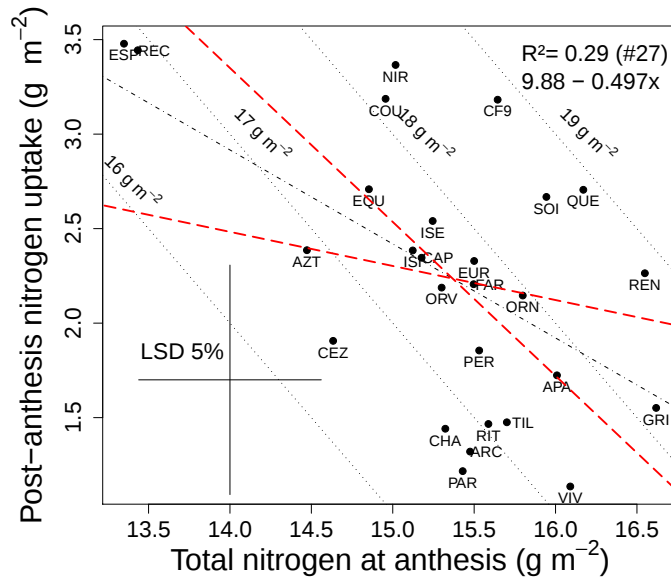


FIGURE 10.2 – Linear regression between mean post-anthesis N uptake (PANU) and mean total N at anthesis (TNA) measured for 27 wheat genotypes grown in 12 different environments ($PANU = 9.88 - 0.497 \times TNA$, $R^2 = 0.29$, $n = 27$, $p\text{-value} \leq 0.01$). Dotted gray lines are iso-total plant N. Long dashed lines represent the 95% confidence interval of the regression line. Genotypes are identified using the first three letters of their names (see Table 10.2 p. 74 for full names).

10.5 Discussion

Twenty-seven wheat cultivars were grown in 27 different environments to evaluate the physiological and genetic reasons for GPD. High variability in GY and GPC was observed that reflected the diversity of experimental agro-climatic conditions. The genetic basis of GPD was confirmed as some cultivars showed consistently positive or negative GPD values. Furthermore, despite significant $G \times E$ interactions, GPD is a robust trait as it shows strong correlation between the GPD calculated for different treatments. This supports the idea that GPD is a useful trait to simultaneously improve GY and GPC through breeding (Monaghan et al., 2001; Oury and Godin, 2007).

10.5.1 Post-anthesis N uptake is the main process accounting for grain protein deviation

Our results highlight the link between GPD and post-anthesis N uptake. In such an experiment where N was supplied on a fixed date, anthesis date might be a source of bias as it may have affected the partitioning of N uptake between the pre and the post-anthesis period, with early genotypes potentially having more N available during grain filling than late ones. However, only five environments showed significant correlation between GPD and anthesis date while the correlation between anthesis date and post-anthesis N uptake was significant in almost all cases. Thus, GPD is related to genetic variability for post-anthesis N uptake independently of anthesis date.

The impact of post-anthesis N uptake on GPD has already been described for winter

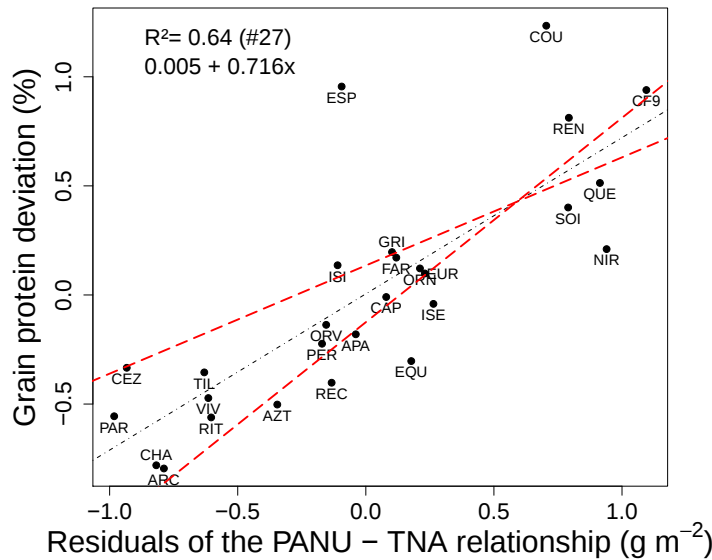


FIGURE 10.3 – Linear regression between grain protein deviation (GPD) and the residuals (resid) of the post-anthesis N uptake (PANU) - total N at anthesis (TNA) relationship. Data are mean across 12 environments for 27 genotypes ($GPD = 0.005 + 0.716 \times \text{resid}$, $R^2 = 0.64$, $n = 27$, $p\text{-value} \leq 0.001$). Dashed lines represent the 95% confidence interval of the regression line. Genotypes are identified using the first three letters of their names (see Table 10.2 p. 74 for full names).

wheat grown in the UK (Monaghan et al., 2001) with the conclusion that the significance of post-anthesis N uptake in determining GPD is related to the differential partitioning of N accumulated before and after anthesis. The most plasticity shown in wheat crop growth with respect to N availability is through tiller production (Oscarson, 2000). An increase in crop sink capacity has a strong impact on GY. By contrast, N assimilated after anthesis does not induce any plastic growth response in the crop and may affect GY only through its positive effect on light use efficiency and its delaying effect on leaf senescence. Therefore, one hypothesis is that the marginal N use efficiency of N assimilated after anthesis is lower than of N assimilated before anthesis. Differential N uptake between the pre and post-anthesis period may then affect N partitioning at the plant level. Vegetative growth ceases around anthesis after which there is very little demand on the newly accumulated N for the synthesis of structural proteins and so is partitioned more efficiently to the grain (Wuest and Cassman, 1992) and thus affects differentially the C and N metabolism compared to N taken up during the pre-flowering period.

The correlation analysis here showed that GPD was mainly accounted for by post-anthesis N uptake but not N remobilization, although a strong negative correlation between post-anthesis N uptake and N remobilization was observed in all the environments studied (r ranging from -0.51 to -0.87, data not shown). Other studies contrast with this as they show a strong association between GPD and pre-anthesis N assimilation or N remobilization to grain. In particular, it has been shown that increasing N remobilization by accelerating senescence (Uauy et al., 2006) or increasing N accumulation before anthesis while maintaining high remobilization efficiency (Slafer et al., 1990) may both increase GPC without reducing

GY. These somewhat contradictory results might be explained by the importance of climatic factors in determining the balance between N remobilization and post-anthesis N uptake. N availability being strongly dependent on soil water availability, the impact of post-anthesis N uptake on GPD might be lessened under climatic conditions where drought stress is high during the grain-filling period.

The antagonism between post-anthesis N uptake and N remobilization may have some physiological bases (Barneix, 2007) but may also be due to experimental errors as both variables are estimated from non independent samplings and thus are subject to sampling errors correlations. In this study, the genotypic variability for N remobilization efficiency was low despite significant genotypic differences ; N remobilization was highly correlated to total N at anthesis (r ranging from 0.88 to 0.98, data not shown) as already shown by Barbottin et al. (2005).

In deciphering the physiological mechanisms relating post-anthesis N uptake to GPD, the relationship between post-anthesis N uptake and total N at anthesis appears more meaningful than between post-anthesis N uptake and N remobilization because there are fewer autocorrelations. This negative relationship between post-anthesis N uptake and total N at anthesis shows that compensation between both traits was incomplete as the slope of the regression did not follow the iso-total plant N curves. This means that any N not absorbed before flowering might not be absorbed during the post-flowering period probably due to either N leaching or climatic factors reducing N availability. However, some genetic variability for post-anthesis N uptake at a given value of total N at anthesis was observed. On average, the correlation between the residuals of the post-anthesis N uptake - total N at anthesis relationship and GPD accounted for 64 % of GPD variability (36% to 84% depending on the environment).

Esperia and Courtôt were frequently strong outliers in this relationship. This may be related to the lack of precision in assessing GPD in these cultivars as they showed markedly low GY and high GPC relative to the panel of genotypes studied. Thus the physiological mechanism relating post-anthesis N uptake to GPD is independent of both anthesis date and total N at anthesis. Contrary to Monaghan et al. (2001), who introduced post-anthesis N uptake and total N at anthesis as explanatory variables explaining GPD, the present study clearly shows that the physiological trait behind GPD is related to post-anthesis N uptake independently of total N at anthesis. This point is of importance as it implies that the physiological trait behind only affects post-anthesis N uptake and thus reduces the range of possible traits determining GPD.

10.5.2 Physiological traits potentially involved in determining post-anthesis N uptake

Three main hypotheses can be proposed to explain the physiological mechanisms underlying the genotypic variability in post-anthesis N uptake at a given total N at anthesis.

The first is related to genotypic differences in accessing soil N. It has been shown for wheat grown in Australia that water uptake efficiency is partly related to genotypic differences in root architecture, leading to differences in the volume of soil explored (Richards et al., 2002; Liao et al., 2004; Christopher et al., 2008). The impact of root architecture on water and N capture has also been investigated by modelling (King et al., 2003; Semenov et al., 2009). Differential access to N in the soil may also be explained by genotypic variability in the tolerance of abiotic constraints. For instance, mechanisms allowing a higher tolerance or avoidance of water deficit may result in a greater uptake of N after anthesis. This hypothesis

is probably more acute in highly stressing environment like Australia where crop density is extremely low leading to highly variable soil exploration levels. The environments tested in the present study are comparatively highly fertile with extreme crop densities. In these situations, one can hypothesize that soil exploration is non limiting, leading to a limited effect of potential genetic differences, thus reducing the scope of this hypothesis.

The second hypothesis to explain the genotypic variability in post-anthesis N uptake might be energy related. An example of this is delayed leaf senescence of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) stay-green phenotypes that by prolonging photosynthetic activity prolong the delivery of carbon to the roots, thus maintaining a higher capacity to extract N from the soil during the post-anthesis period (Borrell et al., 2001). A similar mechanism has been shown in Maize (Rajcan and Tollenaar, 1999b). Extensive physiological and genetic studies have been done on senescence in wheat (Gelang et al., 2000; Gregersen et al., 2008; Snape et al., 2007; Vijayalakshmi et al., 2010) and demonstrated the link between N remobilization and senescence. Nevertheless, none has established any link between N uptake and senescence kinetics pattern.

The third hypothesis is related to genotypic variability in N uptake regulation by plant N status. It is well known that plant N status regulates N influx into the plant (Barneix, 2007). In particular, phloem amino acid concentration regulates the transcription of membrane nitrate transporters (Glass et al., 2002). Thus, genotypic variability in the response of genes triggered by internal signals reflecting plant N status may explain differences in post-anthesis N uptake. To our knowledge, such a mechanism has not been shown in wheat. However, differential expression of nitrate transporters was studied on *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana* (Harrison et al., 2004; Richard-Molard et al., 2008). They showed that genetic variability exists for N uptake and its accumulation in the shoot regardless of the plant N status.

These three hypotheses are not mutually exclusive and other data are lacking at the moment to either confirm or reject any of these. It is possible that the genetic differences observed for post-anthesis N uptake at a given total N at anthesis are caused by the three proposed processes and their potential interactions. Nevertheless, some evidences coming out from other experiments may help to prioritize these hypotheses.

Indeed, data collected on independent mapping populations in numerous environments showed a high correlation ($r^2 = 0.5$) between the GPD calculated at harvest and at 250 degree days (base 0 thermal time) after anthesis (Bogard et al., unpublished results). This pleads for a causal physiological trait having an incidence on N uptake and translocation to the grain early during grain filling. Hypotheses related to genetic variability for root architecture and N uptake regulation fit well this requirement but additional experimental work is needed to identify among these processes which one explains GPD.

10.5.3 Implications for breeding and crop management

From the breeder's point of view, the antagonism between post-anthesis N uptake and total N at anthesis implies that any increase in either trait will probably not lead to an increase in total N uptake by maturity. This may explain why wheat breeding has not substantially increased total N uptake (Calderini et al., 1995). The correlation between the residuals of the post-anthesis N uptake - total N at anthesis relationship and GPD shows that these residuals account for a large proportion of GPD in all the environments studied. The underlying physiological mechanism is likely to control part of post-anthesis N uptake independently of phenology and total N at anthesis and thus is an interesting target by which

to improve post-anthesis N uptake without reducing total N at anthesis, to give an increase in total N uptake at maturity. Furthermore, the close correlation between GPD calculated for each treatment shows that despite significant $G \times E$ interactions, this trait is relatively robust so will be an interesting potential target for future breeding efforts, perhaps in specific agronomic contexts.

It is well known that applying N fertilizer late around the heading stage increases GPC without reducing GY. However N uptake efficiency should be taken into account with late N application as factors limiting N availability, such as water deficit, increase at this stage, *i.e.* the risk of applying fertilizer that will not be taken up by the crop increases, potentially cancelling out the benefits of such a practice. This issue might become pressing within the context of climate change increasing the probability of early summer drought under our latitudes (Parry et al., 2007). While fine tuning of N fertilization is needed, breeding for a higher post-anthesis N uptake without reducing total N at anthesis may be a solution to overcome this problem and improve GPD.

10.6 Conclusion

This analysis of phenotypic correlations calculated per environment between grain protein deviation and N nutrition related processes has revealed the effect of post-anthesis N uptake on grain protein deviation. The physiological mechanisms related to post-anthesis N uptake controlling grain protein deviation appeared independent of anthesis date and total N at anthesis. The underlying physiological trait explaining the genotypic variation observed for grain protein deviation and post-anthesis N uptake affects differentially the C and N metabolisms compared to N taken up during the pre-flowering period. This trait appears as an interesting target to shift the negative correlation between grain yield and grain protein concentration by breeding.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Table 10.1 p. 73 : Summary of environment characteristics.

Funding

This work was supported by the French "Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale" (FSOV). In the framework of the "NUE traits" project [IN-BB-06], a grant was funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) to Matthieu Bogard.

10.6.1 Acknowledgements

We thank Damien Bouthors, Dominique Brasseur, Benoît Dugué, Jean-Pierre Noclercq (INRA Etrées-Mons), Olivier Gardet (INRA Le Moulon), Régis Doucet (Arvalis-Institut du Végétal), Volker Lein (Saaten Union Research), Stephen Sunderwirth (Momont), Jean-Michel Moreau (GAE Recherche), Jean-Michel Delhay (Lemaire Deffontaines) for their help with experiments.

TABLE 10.5 – Phenotypic correlations calculated between grain protein deviation (GPD), post-anthesis N uptake (PANU), total N at anthesis (TNA) and anthesis date (AD) for each of the 12 environments where all traits could be calculated. Significant correlations are in bold ($\alpha = 0.05$). Environment abbreviations are given in Table 10.1 p. 73.

	Environment	GPD	PANU	AD
PANU	04MI-N	0.10		
	04MI+N	0.34		
	04Ms-D	0.76		
	04Ms-N	0.48		
	04Ms+N2	0.54		
	04Ms+N1	0.50		
	05MI-N	0.33		
	05MI+N	0.68		
	05Ms-D	0.74		
	05Ms-N	0.64		
	05Ms+HN	0.44		
	05Ms+N	0.53		
AD	04MI-N	-0.19	0.52	
	04MI+N	0.11	0.18	
	04Ms-D	-0.56	-0.79	
	04Ms-N	-0.54	-0.38	
	04Ms+N2	-0.33	-0.24	
	04Ms+N1	-0.33	-0.54	
	05MI-N	-0.27	0.43	
	05MI+N	-0.43	-0.43	
	05Ms-D	-0.25	-0.54	
	05Ms-N	-0.44	-0.59	
	05Ms+HN	-0.34	-0.59	
	05Ms+N	-0.43	-0.49	
TNA	04MI-N	0.36	-0.74	-0.51
	04MI+N	0.09	-0.74	0.22
	04Ms-D	-0.27	-0.75	0.77
	04Ms-N	-0.05	-0.66	0.22
	04Ms+N2	-0.03	-0.61	0.30
	04Ms+N1	0.00	-0.79	0.60
	05MI-N	0.18	-0.82	-0.56
	05MI+N	-0.07	-0.67	0.45
	05Ms-D	0.16	-0.45	0.60
	05Ms-N	0.20	-0.57	0.42
	05Ms+HN	0.24	-0.63	0.55
	05Ms+N	0.18	-0.52	0.36

Cinquième partie

Étude du déterminisme génétique des relations entre sénescence des feuilles après floraison, teneur en protéines et rendement en grains

Un second article a été soumis à *Journal of Experimental Botany*. Il porte sur les relations entre durée de sénescence des feuilles après floraison, rendement en grains et teneur en protéines. La variabilité génétique pour la durée de sénescence au cours de la période post-floraison ayant été présentée dans l'article précédent comme pouvant expliquer la variabilité génétique pour le GPD.

Dans cet article, une détection de QTL pour la durée de sénescence des feuilles après floraison, le rendement en grains, la teneur en protéines, la date de floraison et la quantité d'azote absorbée à maturité a été réalisée à partir de données acquises sur une population de lignées haploïdes-doublées issue du croisement Toisonдор × CF9107, phénotypée dans un large réseau expérimental (10 combinaisons lieu × année × traitement). Une analyse de la colocalisation des QTL pour ces différents caractères a été réalisée afin de mettre en évidence des QTL stables mais surtout des QTL pleiotropes, affectant à la fois la durée de sénescence foliaire après floraison et le rendement en grains ou la teneur en protéines, contribuant ainsi aux corrélations observées entre ces caractères au niveau phénotypique. Les résultats font apparaître que :

1. les relations entre durée de sénescence des feuilles durant la période post-floraison et rendement en grains ou teneur en protéines sont soumises à de fortes interactions génotype × environnement.
2. l'analyse des colocalisations de QTL a permis de mettre en évidence sur les chromosomes 2A, 2D et 7D des QTL potentiellement pleiotropes affectant la sénescence des feuilles durant la période post-floraison et le rendement en grains ou la teneur en protéines dans certains environnements.
3. ces QTL pleiotropes sont tous associés à des QTL pour la date de floraison liés à la ségrégation de gènes contrôlant la date de floraison (*PPD-D1* et *VRN-D3* en particulier) dans la population d'étude. Ceci met en avant le fait que la date de floraison explique une large part des corrélations phénotypiques entre la sénescence des feuilles durant la période post-floraison et le rendement en grains ou la teneur en protéines. Différents mécanismes sont proposés pour expliquer cette relation forte entre date de floraison et durée de sénescence.
4. l'analyse des effets alléliques des QTL pleiotropes affectant la teneur en protéines et la durée de sénescence des feuilles au cours de la période post-floraison montrent qu'une augmentation de la durée de sénescence est associée à une augmentation de la teneur en protéines dans certains environnements.

Nous faisons dès lors l'hypothèse que, de manière analogue aux phénotypes "stay-green" de sorgho (Borrell et al., 2001), le maintien d'une surface foliaire active au cours de la période post-floraison permet de maintenir l'activité racinaire et l'absorption d'azote. Ce processus physiologique pourrait être modulé selon la disponibilité en azote durant la période post-floraison : en conditions de stress azoté, le retardement ou le ralentissement de la sénescence des feuilles est susceptible d'augmenter l'assimilation du carbone mais pas l'absorption d'azote. Ainsi, sous ces conditions, l'augmentation du rendement conduirait à une plus forte dilution des protéines du grain et à une pente plus négative de la relation teneur en protéines - rendement en grains, ce qui a par ailleurs déjà été observé (Simmonds, 1995; Triboï et al., 2006). A l'inverse, dans des conditions pédo-climatiques où l'azote est disponible au cours de la période post-floraison, le maintien d'une canopée active permettrait de contrebalancer l'augmentation de l'assimilation du carbone par un maintien de l'absorption d'azote.

5. l'utilisation de la sénescence comme critère de sélection pour améliorer la teneur en

protéines sans diminuer le rendement chez le blé serait limitée car largement dépendante du type d'environnements ciblés et en particulier de leur disponibilité en azote durant la période post-floraison.

Chapitre 11

Studies of the relationship between leaf senescence during grain filling, grain yield, grain protein concentration and flowering time in a wheat mapping population.

Running title :

Co-location of QTL for anthesis date, grain protein concentration, grain yield, total above ground N at harvest and leaf senescence during grain filling in winter wheat.

Authors :

Matthieu Bogard^{1,2}, Matthieu Jourdan^{1,2,‡}, Vincent Allard^{1,2}, Pierre Martre^{1,2}, Marie Reine Perretant^{1,2}, Catherine Ravel^{1,2}, Emmanuel Heumez³, Simon Orford⁴, John Snape⁴, Simon Griffiths⁴, Oorbessy Gaju⁵, John Foulkes⁵, Jacques Le Gouis^{1,2,*}

¹ INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 234 Avenue du Brézet, F-63 100 Clermont-Ferrand, France

² Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, F-63 177 Aubière Cedex, France

³ INRA, UMR 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés, Estrées-Mons, F-80 203 Péronne, France

⁴ Crop Genetics Department, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK

⁵ Division of Agricultural Sciences, University of Nottingham, Leicestershire LE12 5RD, UK

[‡] Present address : INRA/INH/UA UMR Génétique et Horticulture (GenHort) Centre INRA d'Angers, 49071 Beaucouzé Cedex, France

***Corresponding author :** Jacques Le Gouis

Email : Jacques.Legouis@clermont.inra.fr

Address : INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales. 234 Avenue du Brézat, F-63 100 Clermont-Ferrand, France

Phone : +33 4 73 62 43 11

Fax : +33 4 73 62 44 53

Date of submission : 25/10/2010

Number of figures : 4

Number of Tables : 6

Abbreviations :

AD, anthesis date; GPC, grain protein concentration; $G \times E$, genotype by environment; GY, grain yield; QTL, quantitative trait loci; AGN_{92} , total above ground N at harvest.

11.1 Abstract

Leaf senescence during grain filling is a good candidate trait for physiological process that might affect separately grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) and thus may help shift the GPC-GY negative relationship existing in most cereal crops. The aim of this study was to decipher the genetic factors contributing to correlations observed at the phenotypic level between leaf senescence during grain filling and GPC or GY. With this aim in view, an analysis of QTL co-location for these traits was carried out on a doubled haploid mapping population grown in a large multi environment trial network. Pleiotropic QTL affecting leaf senescence during grain filling and GY or GPC were identified only in a few environments on chromosomes 2D, 2A and 7D. These were associated with QTL for anthesis date (AD) showing that the phenotypic correlations between leaf senescence during grain filling and GY or GPC are mainly explained by flowering time in this wheat population. It is concluded that the benefit of using leaf senescence as a selection criterion to improve GPC in wheat cultivars may be limited and would largely depend on the targeted environments and particularly on their N availability during the post-anthesis period.

Keywords :

Grain protein concentration, Grain yield, Leaf senescence, N uptake, QTL, *Triticum aestivum* L.

11.2 Introduction

Grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) are two major targets in wheat breeding programs but their improvement is hampered by the negative genetic relationship between these traits (Slafer et al., 1990; Simmonds, 1995; Oury et al., 2003). This negative relationship exists in various cereals species (Feil, 1997) and illustrates the inter-connection between carbon (C) and nitrogen (N) metabolism at the canopy level. However, it has been shown that traits increasing post-anthesis N uptake are likely to increase GPC without affecting GY (Bogard et al., 2010), and thus may help breeders to shift the GPC-GY negative

relationship. It has been postulated that post-anthesis leaf senescence might be an interesting candidate as a physiological process affecting separately GPC and GY (Bogard et al., 2010).

Senescence kinetics is a highly regulated process under both genetic and environmental control, allowing recycling of nutrients (N in particular) from vegetative tissues towards reproductive organs (Lim et al., 2007; Masclaux-Daubresse et al., 2008; Guiboileau et al., 2010). In monocarpic plants such as wheat, leaf senescence is associated with the translocation of leaf N to the grains, which in wheat accounts for 40 to 90% of final grain N (Sanford and MacKown, 1986; Kichey et al., 2007). The senescence process is a key junction between C and N metabolism. At the canopy level, the potential C assimilation during the grain-filling period is determined both by the date of the onset, and the rate, of senescence (Thomas and Howarth, 2000; Spano et al., 2003). On the other hand, the maintenance of the green leaf area might also affect the ability of the crop to take up soil N during the post-anthesis period, as C skeleton and energy are required to assimilate N (Hirel et al., 2007). Thus, genetic variability for leaf senescence might affect GY and GPC differentially, and soil N availability might considerably affect the impact on these major agronomical traits.

Previous studies on senescence and its relationship with major agronomic processes have mainly focus on the interest of the “stay-green” traits in increasing or maintaining GY under stressful conditions such as drought (Borrell et al., 2001; Spano et al., 2003; Harris et al., 2007). This is presumably related to the evidence that GY is sink limited under favourable post-anthesis conditions but may be source limited under abiotic stress (Borrás et al., 2004). However, unexpected negative correlations between a stay green phenotype and GY have also been reported (Jiang et al., 2004). Considering wheat, only a few studies have been carried out to reveal the genetic factors contributing to the relationship observed between GY and post-anthesis leaf senescence (Verma et al., 2004; Snape et al., 2007; Vijayalakshmi et al., 2010) and none has reported any QTL analysis for both senescence, GY and GPC.

Leaf senescence during grain filling might contribute to GPC through its effects on N uptake and post-anthesis N remobilization. Indeed, leaf senescence might be a physiological marker of the ability to maintain post-anthesis N uptake as is the case for sorghum (*Sorghum bicolor* L.) stay-green phenotypes under drought conditions (Borrell et al., 2001). On the other hand, the cloning of the *NAM-B1* gene in *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (Uauy et al., 2006) increases GPC without reducing GY through an accelerated senescence associated with higher N remobilization and increased N partitioning to the grain (Waters et al., 2009). This indicates that early senescence could favour high GPC. It has been shown recently that a potential ortholog of the wheat *NAM-B1* gene (Distelfeld et al., 2008) found in barley (*Hordeum vulgare* L.) (Jukanti and Fischer, 2008) was not only associated with post-anthesis leaf senescence but also with plant development well before anthesis (Lacerenza et al., 2010). These apparent contradictory results indicate the need for a more comprehensive understanding of the relationship between leaf senescence during grain filling and GPC that takes explicitly into account plant phenology.

The objectives of this study were

1. to assess the phenotypic correlations between leaf senescence during grain filling, AD, GPC and GY taking into account environment specific relationships including N availability
2. to identify the genetic factors contributing to these different traits
3. to suggest potential physiological processes underlying the phenotypic correlations observed between leaf senescence during grain filling and GY or GPC.

With this aim in view, a mapping population comprising 140 doubled haploid lines from

the cross Toisonдор $\times$ CF9107 was grown in a large multi-environment trial network comprising different years, locations and N treatments. An analysis of QTL co-location for anthesis date (AD), GY, GPC, total above ground N at harvest (AGN₉₂), and leaf senescence during grain filling was carried out. Analyses of the allelic effects allowed hypotheses to be developed on the possible physiological traits linking post-anthesis leaf senescence and GY or GPC. The benefit of using leaf senescence during grain filling as a selection criterion to improve wheat cultivar is discussed.

11.3 Materials and methods

11.3.1 Plant material, growing conditions and plant sampling

The recombinant doubled haploid winter wheat population from the cross Toisonдор $\times$ CF9107 was used in this study. Toisonдор was released in France in 2003 and CF9107 is a breeding line from the INRA breeding program that has not been registered. Both are considered as bread making cultivars. Allelic composition of these cultivars was checked for major genes involved in plant development response (*Ppd-D1*, *Rht-D1*, *Rht-B1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1*) and found to be polymorphic for *Ppd-D1* only. The Toisonдор $\times$ CF9107 population comprises 140 doubled haploid lines (DHL) derived from F₁ plants using the “maize cross system” (Laurie and Bennett, 1988). The parents of the population and the winter bread wheat cultivar Quebon (Saaten-Union, Germany) were used as controls.

Field experiments were carried out in 2007-2008 at two locations in France (Clermont-Ferrand, cf and Le Moulon, ml) under potential N (Np) corresponding to local agricultural practices. During the 2008-2009 growing season this population was grown at two locations in France (cf and Estrées-Mons, ms) and two in the UK (Norwich, nw and Sutton-Bonington, sb). Two N treatments were applied at each site in 2008-2009 : potential N treatment (Np) and a low N treatment (Nl) with N supply corresponding to 20 - 50% of the potential N treatment (Table 11.1 p. 95).

TABLE 11.1 – Characteristics of the environments studied : name of the locations, coordinates (a.s.l, “above sea level”), plot size, harvest year of the experiments. Cumulative rainfall, average daily air temperature and number of days with maximum daily air temperature above 25°C (Ndays25) were calculated between the 1st of June and the 1st of August of the harvest year, roughly corresponding to the period between anthesis and physiological maturity. Soil N at the end of winter (from 0cm to -90cm depth), total N fertilizer supplied during the experiments (N fertilizer was applied using split applications as described in the “Materials & Methods” section) and environment’s abbreviations are given.

Location	Coordinates	Plot size (m)	Harvest year	Cumulative rainfall (mm)	Average daily air temperature (°C)	Ndays25	Mineral soil N (kg N ha ⁻¹)	N fertilizer (kg N ha ⁻¹)	Environment abbreviation
Clermont-Ferrand	45°78' N	1.5 × 5	2008	183	18	28	115	180	cf.8.Np
	3°08' E		2009	151	19	28	75	50	cf.9.Nl
	401m a.s.l							200	cf.9.Np
Le Moulon	48°42' N 2°08' E 156m a.s.l	1.3 × 5	2008	105	18	22	83	120	ml.8.Np
Estrées-Mons	49°08' N 3°00' E 85m a.s.l	1.3 × 4	2009	88	17	21	30	50 200	ms.9.Nl ms.9.Np
Norwich	52°63' N 1°30' E 14m a.s.l	1.5 × 4	2009	195	15	1	35	50 200	nw.9.Nl nw.9.Np
Sutton-Bonington	52°82' N 1°25' E 38m a.s.l	1.65 × 5	2009	157	16	5	23	60 240	sb.9.Nl sb.9.Np

In each location, an initial application of 50 to 60 kg N ha⁻¹ was applied around the end of tillering (GS25) for both N treatments. For the Np treatment, 60 to 190 kg N ha⁻¹ were applied in two equal split applications during stem elongation (between GS31 and GS32) and between flag leaf tip appearance (GS37) and male meiosis (GS39). Each split was applied on the same calendar date for all genotypes. This resulted in 10 location × year × N treatment combinations referred hereafter as different environments.

Table 11.1 p. 95 shows the main characteristics of the environments studied with rough climatic indicators calculated during approximately the grain filling period, highlighting the differences between the Northern and Southern locations of the trial network.

Field experiments were arranged in an incomplete block design with two blocks, each representing a N treatment, and four sub-blocks per block within which lines were randomly arranged. Among the 140 DHL, 92 were present in only one sub-block while 48 were repeated twice in different sub-blocks. Each sub-block comprised 50 plots with Toisonдор, CF9107 and Quebon as controls and a subset of 23 DHL among the ones repeated once, and 24 DHL among the ones repeated twice. Details of plot size in each trial are given in Table 11.1 p. 95. Seed rate was adjusted at each site to establish about 200 plants m⁻² at the end of winter. When necessary, fungicides, insecticides and herbicides were applied to achieve optimal management of the crop.

11.3.2 Determination of dry mass and nitrogen concentrations

Anthesis dates (AD ; day of the year ; DOY) were recorded when 50% of the spikes carried visible stamens (Zadocks' stage GS61 ; (Zadoks et al., 1974)). All plots of all the trials with area ranging from 4 to 7m² depending on the location were machine harvested with a combine harvester and GY (g m⁻²) is reported on a 0% moisture basis. Above ground biomass and N were determined at harvest (Zadocks' stage GS92) from 0.3 to 1.3 m² samples in 2008 at cf for the Np treatment and in 2009 at cf and ms for both N treatments (five environments). Grain sub-samples were taken from the combine harvest samples and their dry mass was determined after oven drying at 80°C for 48 h.

N concentrations were determined by near infrared spectroscopy (NIRS) using a NIR 6500 analyzer (FOSS, Höganäs, Sweden) equipped with a cell cup. GPC (%) was calculated as grain N concentration multiplied by 5.7 (Sosulski and Imafidon, 1990). In order to determine above ground N at harvest (AGN₉₂ ; g N m⁻²) grains and straws from the samples taken at GS92 were separated, and their dry mass was determined after oven-drying at 80°C for 48 h. N concentration was determined as described above for whole grains and on milled samples for straws. N concentrations were estimated using NIRS predictions based on calibrations obtained from the N concentration of reference samples measured using the Dumas method (AOAC method n° 7-024) for straw, and the Kjeldahl method (AOAC method n° 979-09) for grains. All N and protein concentrations were adjusted to 0% moisture content.

11.3.3 Visual scoring of leaf and canopy senescence

Senescence phenotyping was done visually on the penultimate leaves of the main stems on five plants per plot in Clermont-Ferrand or on the whole canopy at all other locations. Scoring was done twice a week from anthesis to complete canopy senescence. Data were fitted using a monomolecular-logistic equation (Génard et al., 1999) describing leaf senescence kinetics during grain filling as a two phase process (Fig. 11.1 p. 98) :

$$score = p0 + p1 \times (1 - \exp(\frac{-p2 \times TTA}{p1})) + \frac{10 - p1 - p0}{1 + \exp(-4 \times p3 \times \frac{TTA - p4}{10 - p1 - p0})}$$

where *score* is the observed senescence score ranging from 0 to 10, *TTA* is the thermal time after anthesis (base 0°C), *p0* is the score at anthesis, *p1* is the score at the end of the slow phase, *p2* is the maximal rate of senescence during the slow phase, *p3* is the maximum rate of senescence during the rapid phase, and *p4* corresponds to the thermal time when *p3* is reached.

Fitted kinetics were obtained by minimizing the residual sum of square between observed and fitted data. The duration of each phase and the total duration of the senescence period were derived after the inflexion point separating the two phases had been determined as the thermal time when the second derivative of the equation reached its maximum. The end of the first phase, in which green area loss is slow, corresponds to the date of the onset of the senescence phase (ONSEN; °C days) and the duration of the second phase, in which most of the green area loss occurs, is hereafter referred to as the duration of the senescence phase (SEN; °C days). These traits, as well as the total duration of senescence (durTot; °C days), which corresponds to the sum of ONSEN and SEN, were used as standard traits in QTL analysis.

11.3.4 Genotyping

Genomic DNA was extracted from leaves frozen and grounded in liquid N using the Qiagen Biosprint plant DNA kit (Qiagen, USA). DNA concentration was then adjusted to 100ng μL^{-1} using a Microlab Star robot (Hamilton Robotics, USA). DArT® typing was obtained from the Diversity Arrays Technology Pty Ltd Company (<http://www.triticarte.com.au>) from 30 μL of DNA solution. Genomic DNA of the parents and DHL were hybridised to the wheat DArT® array v2.3 and polymorphisms were detected and scored as previously described by (Akbari et al., 2006).

SSR markers were chosen in order to complete the DArT® typing of the D genome, in particular. SSR typing was done using the following protocol except for the *Ppd-D1* gene that was typed according to Beales et al. (2007). A 8 μL PCR reaction containing 1 $\times$ PCR buffer (Qiagen, USA), 0.2 mM dNTP, 0.5 mM of primer mix (2.5 μM forward primer and 25 μM reverse primer), 0.5 μM of M13 tag with one of the four fluorescent dyes (6-FAM, VIC, NED and PET), 0.03 unit Taq DNA polymerase (Qiagen, USA) and 60ng genomic DNA was used to perform all PCR reactions in a Veriti 384 well thermocycler® (Applied Biosystem, USA). Cycling consisted of one step of denaturation at 94°C for 10min followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min with a final extension step of 72°C for 5 min and 4°C indefinitely. 5 μL of PCR products were then diluted in 190 μL ultrapure water and PCR products amplified with different fluorescent dyes and were then multiplexed to a final volume of 7 μL including 2 μL DNA, 12pL GeneScan™-500 LIZ® size standard (Applied Biosystem, USA) and Hi-di™ formamide quantum satis (Applied Biosystem, USA). Mixed PCR products were denatured at 94°C for 5 min then chilled on ice. Amplified PCR products were then separated by capillary electrophoresis using the ABI 3730xl DNA Analyser and separated fragments were analysed using the GeneMapper® software v3.7 (Applied Biosystem, USA) following the manufacturer's instructions.

Single nucleotide polymorphism (SNP) typing was done using a set of 384 sequence polymorphisms discovered in a panel of 16 hexaploid wheat lines. SNPs were genotyped using the Illumina Golden Gate technology (Akhunov et al., 2009) as previously described (Oliphant

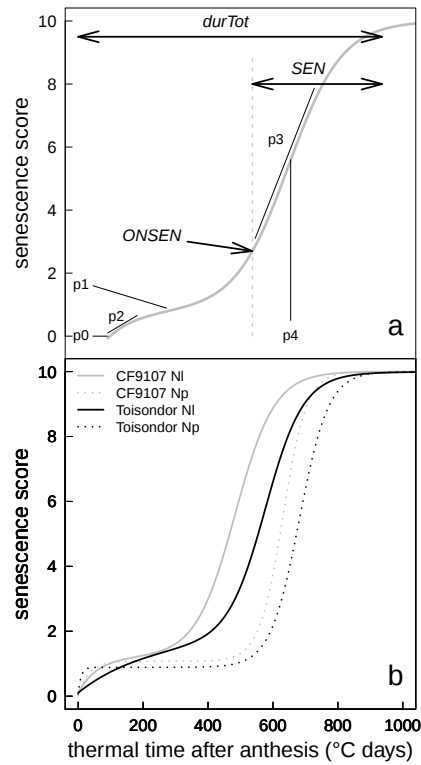


FIGURE 11.1 – Definitions of the parameters used to fit the observed senescence scores during the post-anthesis period (a) and examples of fits using mean values across potential N (Np) or low N (Nl) treatments for each of the two parents of the Toisonador $\times$ CF9107 wheat mapping population (b). Senescence was scored visually from zero (fully green leaves) to 10 (fully senesced leaves) from anthesis to complete canopy senescence. Observed scores were fitted over accumulated thermal time after anthesis using the monomolecular-logistic equation described in the “Materials and Methods” section. Equation parameters are : p_0 , senescence score at anthesis ; p_1 , senescence score at the end of the slow phase ; p_2 , maximal rate of senescence during the slow phase ; p_3 maximum rate of senescence during the rapid phase ; and p_4 , thermal time when p_3 is reached. The onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN) and the total duration of leaf senescence during grain filling (durTot) were used as standard traits in QTL analysis.

et al., 2002). Genotyping reactions were carried out using 150 ng of genomic DNA per line according to the manufacturer’s instructions.

11.3.5 Genetic mapping

The genetic map used in this study was obtained using 500 unique polymorphic markers comprising 406 DArT®, 49 SSR, 44 SNP markers and one “gene marker” for the *Ppd-D1* gene. It was generated using CARTHAGENE v1.0 (De Givry et al., 2005) using the Haldane mapping function. First, linkage groups were defined using the “group” command with $\text{LOD} \geq 3$ and genetic distance $\leq 30\text{cM}$. Marker order was then defined by flipping markers and choosing the best order.

Although DArT® markers are highly clustered (Francki et al., 2009) and markers inside a cluster do not bring any additional information for QTL analysis, all DArT® markers were kept in order to facilitate subsequent comparative studies across populations by meta-analysis.

11.3.6 QTL detection

QTL analysis was carried out using the Rqtl package (Broman et al., 2003). First, QTL detection was carried out using simple interval mapping (SIM). LOD genome wise thresholds were determined for each of the 65 trait $\times$ environment combinations using 1000 permutations and by taking the 95 percentile LOD score as threshold.

QTL detection was then refined using composite interval mapping (CIM) introducing the QTL identified by simple interval mapping as covariates and discarding potential marker covariates surrounding the position of interest in a 40cM window. LOD thresholds for CIM were determined on 1000 permutations for each of the 65 trait $\times$ environment combinations. The extended Haley and Knott regression method was used both for SIM and CIM (Feenstra et al., 2006). The confidence interval of the QTL was based on a LOD-1 drop off (Manichaikul et al., 2006).

11.3.7 Analysis of QTL co-location

Analysis of QTL co-location was carried out using the Biomercator v2.1 software (Arcade et al., 2004). This software allows QTL meta-analysis to be performed based on the theory developed by Goffinet and Gerber (2000) who showed that it is robust enough to handle data collected on non independent experiments (*i.e.* obtained on a unique mapping population grown in different environments, as it is the case in this study). Biomercator allows choosing the best among k models ($k = 1, \dots, n$) describing the number of QTL cluster on a given linkage group.

This analysis was done in order to cluster QTL and consequently identify “stable” and pleiotropic QTL. “Stable” QTL were identified by projecting QTL detected for the same trait in different environments. Any linkage group carrying QTL detected for a given trait in at least 30% of the environments studied was considered as a potential linkage group carrying stable QTL (*i.e.* linkage group carrying at least three QTL for AD, GY, GPC, leaf senescence duration or two QTL for AGN₉₂). Regarding pleiotropic QTL, these were identified by projecting QTL detected for different traits in the same environment and looking for QTL belonging to the same cluster. This allowed the identification of potentially pleiotropic QTL having an effect on both leaf senescence and some of the major agronomic traits on which this study focuses.

All the statistics and the graphics were performed using Rv2.11.1 (R Development Core Team, 2008) except graphics representing QTL confidence intervals on the genetic map obtained from the MapChart v2.2 software (Voorrips, 2002).

11.4 Results

11.4.1 Genetic and environment effects

Large variability was observed for GY (range from 278 to 1154 g m⁻²) and GPC (range from 4.7 to 15.7%) reflecting the contrasting agro-climatic conditions represented in this

large multi-environment trial network (Table 11.3 p. 101).

The linear regression between GPC and GY calculated environment by environment was significant in six out of 10 environments (Table 11.2 p. 100). This relationship was highly unstable with slopes ranging from -0.006 to +0.001 and correlation coefficients ranging from -0.41 to +0.09 (Table 11.2 p. 100). The weakness of the GPC-GY relationship allowed analysis of these traits separately.

TABLE 11.2 – Intercepts, slopes, correlation coefficients and p-values for the grain protein concentration-grain yield (GPC-GY) relationship for the Toisonдор $\times$ CF9107 mapping population in the different environments studied. Values in bold highlight environments where the GPC-GY relationship was significant. Nl and Np represent values obtained using mean GY and GPC for the low and potential N treatments, respectively. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95.

environment	intercept (%)	slope (% g ⁻¹ m ²)	Correlation coefficient	p-value
cf.8.Np	13.92	-0.002	-0.17	0.04
cf.9.Nl	7.70	0.000	0.03	0.71
cf.9.Np	10.34	-0.001	-0.09	0.27
ml.8.Np	11.72	-0.002	-0.13	0.17
ms.9.Nl	9.66	-0.006	-0.41	0.00
ms.9.Np	14.27	-0.005	-0.29	0.00
nw.9.Nl	7.29	0.001	0.09	0.27
nw.9.Np	14.43	-0.003	-0.22	0.01
sb.9.Nl	9.73	-0.003	-0.27	0.00
sb.9.Np	13.96	-0.002	-0.28	0.00
Nl	10.81	-0.006	-0.44	0.00
Np	14.43	-0.004	-0.35	0.00

TABLE 11.3 – Descriptive statistics on anthesis date (AD), grain yield (GY), grain protein concentration (GPC), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling for the Toisondor $\times$ CF9107 mapping population. Means are associated with minimum and maximum values in brackets for each environment, each N treatment (Np : potential N; Nl : low N) and across all the environments studied. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95. Large variability was also observed for AD (range from DOY 139 to day 165). On average, the difference between the earliest and the latest genotype was 15 days.

Environment	AD (Julian days)	GY (g m ⁻²)	GPC (%)	ONSEN (°Cdays)	SEN (°Cdays)	durTot (°Cdays)
sb.9.Nl	155 [144 ; 164]	506 [300 ; 680]	8.4 [6.6 ; 10.3]	419 [101 ; 654]	367 [100 ; 679]	787 [541 ; 1025]
ms.9.Nl	155 [146 ; 165]	533 [386 ; 661]	6.2 [4.7 ; 8]	462 [341 ; 560]	292 [207 ; 392]	754 [584 ; 880]
cf.9.Nl	149 [144 ; 155]	586 [369 ; 836]	7.8 [6.4 ; 9.5]	444 [352 ; 549]	202 [134 ; 294]	646 [514 ; 739]
nw.9.Nl	153 [147 ; 162]	654 [445 ; 951]	7.9 [5.4 ; 11.2]	489 [241 ; 643]	281 [77 ; 507]	770 [631 ; 877]
cf.9.Np	150 [144 ; 156]	690 [477 ; 896]	9.9 [8.8 ; 11.5]	478 [346 ; 605]	144 [73 ; 223]	622 [492 ; 768]
cf.8.Np	148 [141 ; 155]	767 [450 ; 1016]	12.4 [10.4 ; 15.7]	664 [560 ; 810]	346 [182 ; 699]	1010 [770 ; 1379]
ms.9.Np	154 [145 ; 164]	796 [635 ; 972]	10.2 [7.3 ; 12.6]	562 [448 ; 639]	230 [137 ; 337]	792 [680 ; 897]
sb.9.Np	154 [144 ; 163]	858 [278 ; 1153]	12.4 [10 ; 15.2]	495 [295 ; 678]	283 [68 ; 615]	778 [566 ; 1013]
nw.9.Np	155 [147 ; 165]	883 [484 ; 1154]	12.2 [9.3 ; 15.2]	607 [469 ; 735]	218 [70 ; 353]	826 [678 ; 1022]
ml.8.Np	150 [139 ; 158]	928 [794 ; 1124]	10.2 [8.4 ; 11.9]	542 [434 ; 704]	157 [65 ; 299]	700 [564 ; 844]
Np	152 [139 ; 165]	817 [278 ; 1154]	11.3 [7.3 ; 15.7]	558 [295 ; 810]	232 [65 ; 699]	790 [492 ; 1379]
Nl	153 [144 ; 165]	571 [300 ; 951]	7.6 [4.7 ; 11.2]	455 [101 ; 654]	283 [77 ; 679]	738 [514 ; 1025]
Across environments	152 [139 ; 165]	719 [278 ; 1154]	9.8 [4.7 ; 15.7]	517 [101 ; 810]	253 [65 ; 699]	769 [492 ; 1379]

The date of the onset of the senescence phase (ONSEN, averaging 517°Cdays) was twice the duration of the senescence phase (SEN, averaging 253°Cdays). The leaf senescence kinetics of the two parents under low and high N are shown Fig. 11.1 p. 98. ONSEN was consistently higher for the high N treatments than for the low N treatments and this latter trait explained about 50% of the environmental variation in GY and GPC (Fig. 11.2 p. 102). Environments characterized by a delayed ONSEN had higher GY and GPC.

The genotype and environment effects and $G \times E$ interactions for the three control genotypes that were fully replicated in all the trials were all significant, except for SEN for which no significant differences between genotypes was found (Table 11.4 p. 103). Significant differences between the parents of the DH population used in this study were found for all traits except for GY and SEN.

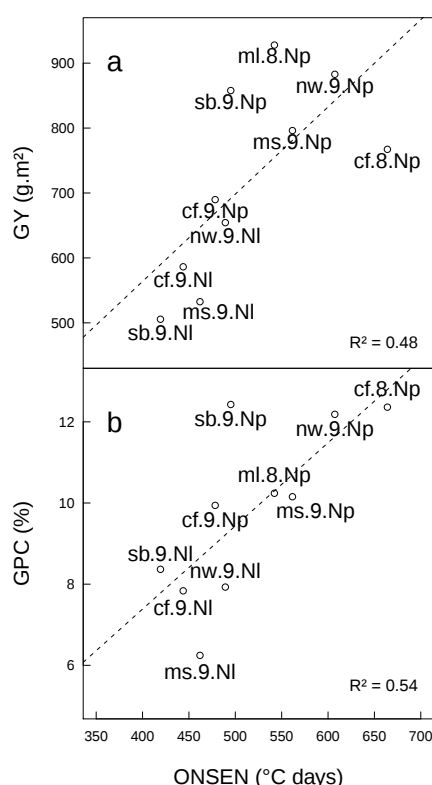


FIGURE 11.2 – Linear regression between mean onset of the senescence phase (ONSEN) and (a) grain yield (GY) or (b) grain protein concentration (GPC). Values are means across 140 doubled haploid lines of the Toisonдор $\times$ CF9107 wheat mapping population for each environment studied. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95.

TABLE 11.4 – Analyses of variance based on the three control cultivars for anthesis date (AD), grain yield (GY), grain protein concentration (GPC), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling. Significance of genotype, environment and $G \times E$ interaction are given (., *, **, *** denote significance at the 10% ($P = 0.1$), 5% ($P = 0.05$), 1% ($P = 0.01$) and 0.1% ($P = 0.001$) levels, respectively). Coefficients of variation and mean value for each control (CF9107, Toisonдор, Quebon) are given. Lower-case letters indicate grouping based on Tukey significant differences. Degrees of freedom were 2, 9 and 17 for the genotype, environment and $G \times E$ interaction, respectively.

traits	Genotype effect	Environment effect	$G \times E$ interaction	Coefficients of variation	CF9107	TOISONDOR	QUEBON
AD	***	***	*	7	150 ^c	152 ^b	153 ^a
GY	**	***	.	11.8	708 ^{ab}	665 ^b	734 ^a
GPC	***	***	**	6.2	10.5 ^a	9.6 ^b	10.7 ^a
ONSEN	**	***	***	13.5	470 ^b	519 ^a	482 ^b
SEN	ns	***	***	22	236 ^a	222 ^a	221 ^a
durTot	***	***	***	7.2	706 ^b	742 ^a	703 ^b

11.4.2 Phenotypic correlations between major agronomic traits and leaf senescence during grain filling

Significant negative correlations (r) between GPC and AD were found in five out of 10 environments (Table 11.5 p. 105). In four environments, no significant relationship between GPC and any of the senescence related traits was found (cf.9.Nl, cf.9.Np, ml.8.Np, nw.9.Nl). In the other environments studied, either a positive (cf.8.Np, ms.9.Np) or a negative relationship (nw.9.Np, sb.9.Np) was found between GPC and ONSN. Across years and locations, this correlation appeared significant only under low N input, the sign of the correlation being negative. Significant positive correlation coefficients between GPC and SEN were found in ms.9.Nl, and ms.9.Np. Across years and locations, this correlation was significantly positive under both N treatments. Finally, negative correlations were found between GPC and durTot in sb.9.Nl and nw.9.Np, while positive correlations were found in ms.9.Nl, ms.9.Np. Across years and locations, the correlation between GPC and durTot was not significant for any of the N treatments.

The correlation coefficients calculated between GY and AD were significant in seven out of 10 environments with r ranging from -0.37 to 0.50 (Table 11.5 p. 105). The shift in the sign of the correlation coefficients illustrates the impact of $G \times E$ interactions on the relationship between GY and AD. This correlation was positive in the northern locations of the trial network but negative in the southern ones (correlation between latitude coordinates and correlation coefficients between GY and AD was 0.73; data not shown). The effect of AD on GY was mainly due to an effect on grain number per area (significant in five out of seven environments where grain number per area could be calculated, r ranging from 0.24 to 0.43; data not shown).

The correlation coefficients between GY and ONSN were positive in the four environments where they were significant (r ranging from 0.33 to 0.49) whatever the N treatment. The correlation coefficients between GY and SEN were negative in the three environments where they were significant (r ranging from -0.39 to -0.28) and appeared significant only at low N. Finally, the correlation coefficients between GY and durTot were significant in six environments (r ranging from -0.34 to +0.38), two being negative and four being positive, again illustrating the impact of $G \times E$ interactions on this relationship. Two other environments showed a non significant but clear tendency of GY to be positively associated with durTot (cf.8.Np and cf.9.Nl, $P = 0.08$ and 0.09 respectively). No significant correlation was found between these two traits in any of the N treatments so the shift in the sign of the correlation between GY and durTot appeared rather related to a location effect (negative sign at Estrées-Mons whatever the N treatment while it was positive at Norwich).

The correlation between AD and AGN_{92} was significant in three (all were Np treatments) out of five environments where AGN_{92} could be calculated (r ranging from -0.31 to 0.28; data not shown). Late genotypes had lower AGN_{92} except in cf.8.Np where the correlation between AD and AGN_{92} was positive.

TABLE 11.5 – Phenotypic correlation coefficients for grain protein concentration (GPC) and grain yield (GY) *versus* anthesis date (AD), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN), and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling (durTot) among 140 doubled haploid lines of the Toisonдор $\times$ CF9107 wheat mapping population. Significant correlation coefficients are in bold ($\alpha = 0.05$). Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95. Nl : Low N treatment ; Np : potential N treatment.

Environment	GPC				GY			
	AD	ONSEN	SEN	durTot	AD	ONSEN	SEN	durTot
cf.8.Np	-0.22	0.27	-0.03	0.08	0.06	0.33	0.03	0.15
cf.9.Nl	0.01	0.06	0.06	0.09	-0.05	0.14	0.10	0.15
cf.9.Np	0.11	-0.13	0.03	-0.11	-0.39	0.36	0.07	0.38
ml.8.Np	-0.19	0.13	0.02	0.15	0.07	0.01	0.01	0.02
ms.9.Nl	-0.36	0.12	0.29	0.29	0.42	-0.13	-0.36	-0.34
ms.9.Np	-0.54	0.34	0.26	0.51	0.33	0.02	-0.28	-0.19
nw.9.Nl	-0.06	-0.13	0.15	0.03	0.40	0.48	-0.39	0.21
nw.9.Np	-0.11	-0.33	0.12	-0.17	0.50	0.49	-0.10	0.32
sb.9.Nl	0.08	-0.08	-0.07	-0.19	0.32	0.17	-0.14	0.01
sb.9.Np	-0.18	-0.26	0.08	-0.14	0.34	0.12	0.04	0.18
Nl	-0.23	-0.33	0.30	-0.03	0.43	0.29	-0.32	-0.05
Np	-0.31	-0.12	0.24	0.10	0.36	0.22	-0.13	0.10

11.4.3 QTL detection for AD, GY, GPC, AGN₉₂, and leaf senescence during grain filling

QTL detection was carried out on the 140 doubled-haploid lines from the cross Toison-dor × CF9107 grown in 10 environments for AD, GY, GPC, senescence durations (durTot, ONSen, SEN) and in five environments for AGN₉₂ leading to 65 trait × environment combinations.

Five hundred polymorphic markers were typed on this population. The genetic map comprised 475 markers (25 markers were discarded as they could not be linked). Its total length was 2,344cM with 29 linkage groups representing the 21 wheat chromosomes and an averaged length of 81 cM per linkage group. The average interval between consecutive markers was 9 cM after removing clustered DArT® markers (*i.e.* markers mapped on the same location that do not bring any additional information for QTL detection). The homoeologous group 4 appeared to be under-represented with only 24 markers compared to the 75 markers mapped on average for the other homoeologous groups. The D genome had the least marker coverage with only 52 markers compared to the 208 and 215 markers mapped on the A and B genomes, respectively.

Results of QTL analysis are publicly available at <http://urgi.versailles.inra.fr/GnpMap/mapping/welcome.do> and are summarized in Table 11.6 p. 107. A total of 91 QTL were detected for all trait × environment combinations.

On the whole set of QTL, 35 were detected for AD with an additive effect ranging from - 5 to + 9 days. Individually, these QTL explained 2 to 61% of the phenotypic variance observed for AD.

A total of 18 QTL were found for GPC with an additive effect ranging from - 1 to + 1 point of GPC and a percentage of variance explained ranging from 8 to 24%.

Eight QTL were detected for GY with an additive effect ranging from - 126 g m⁻² to + 48 g m⁻². Individually, QTL detected for GY explained from 9 to 19% of the phenotypic variance observed for GY.

Among the QTL detected for traits related to leaf senescence, 11 were detected for ONSen (additive effect ranging from -84 to +36 °Cdays), five for SEN (additive effect ranging from -83 to +81 °Cdays) and nine for durTot (additive effect ranging from -102 to +48 °Cdays). Individually, these QTL explained 6 to 47%, 10 to 21% and 4 to 50% of the phenotypic variance observed for these different traits, respectively.

On the whole set of QTL, five were detected for AGN₉₂ with an additive effect ranging from - 1 g N m⁻² to + 2 g N m⁻². Individually, these QTL explained from 9 to 14% of the phenotypic variance for AGN₉₂.

The proportion of the phenotypic variance explained, taking into account all the QTL detected in a given environment for GY, GPC, AGN₉₂, ONSen, SEN and durTot (“full model R²” column in Table 11.6 p. 107), was low and thus indicated that environment effects and / or G × E interactions were strong for all these traits. Conversely, genetic factors determining AD appeared strong as 62 to 88% of the phenotypic variance was explained by the final model.

TABLE 11.6 – Summary of the results of QTL analyses using the Toisondor $\times$ CF9107 wheat mapping population grown in 10 environments for anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), grain yield (GY), above ground N at harvest (AGN₉₂), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling. Information displayed for each trait : the chromosomes for which QTL were found, the number of QTL, the number of environments where QTL were found, the minimum and maximum values for individual R² (percentage of phenotypic variance explained by individual QTL), full model R² (percentage of phenotypic variance explained taking into account all the QTL identified for a given trait in a given environment) and additive effect of the CF9107 parent.

Trait	Chromosome	Number of QTL	Number of environments	Individual R ² (%)	Full model R ² (%)	Additive Effect
AD	2A,2D,4A,4B,7A,7B,7D	35	10	[2;61]	[62;88]	[-9;+9]
GPC	2A,2D,3A,3B,5A,7D	18	9	[8;24]	[15;46]	[-1;+1]
GY	2D,3B,6B,7B,7D	8	7	[9;19]	[9;40]	[-126;+48]
ONSEN	1B,2A,2D,6B,7B,7D	11	6	[6;47]	[13;54]	[-84;+36]
SEN	2D,5A,7B,7D	5	5	[10;21]	[10;21]	[-83;+81]
durTot	2A,2D,7B,7D	9	7	[4;50]	[10;70]	[-102;+48]
AGN ₉₂	2A,2D,5A	5	5	[9;14]	[9;14]	[-1;+2]

11.4.4 Stable QTL for AD, GY, GPC, AGN₉₂ and leaf senescence during grain filling

Regarding AD, linkage groups carrying potential stable QTL were on 2A2, 2D, 4A, 4B1 and 7D (Table 11.7 p. 109). The 7D and 2D chromosomes appeared to carry highly stable QTL as QTL for AD were identified on these chromosomes in all the environments studied. Meta-analysis allowed clustering of these QTL into one unique meta-QTL between 22 and 40cM for 7D and 97 to 105cM for 2D (including the *Ppd-D1* locus). The QTL cluster on 7D presumably includes the *Vrn-3* gene located near the marker “barc126” according to Bonnin et al. (2008). Averaged allelic effects across environments of the 2D and 7D QTL for AD were seven and four days, respectively. On linkage groups 2A2, 4A and 4B1, meta-analysis clustered QTL into one unique meta-QTL for each linkage group spanning a region from 13 to 43 cM, 13 to 32 cM and 0 to 5 cM respectively.

Linkage groups potentially carrying stable QTL for GPC were on 2A2 and 3B2 with QTL detected on these linkage groups in seven and five environments, respectively (Table 11.7 p. 109). These stable QTL were not specific to any particular N treatment. On 2A2, meta-analysis allowed the identification of a unique meta-QTL spanning a region from 0 to 4 cM. The high number of QTL belonging to this meta-QTL makes it the most interesting genomic location determining GPC in this study. On 3B2, meta-analysis allowed grouping of all QTL into a meta-QTL with a confidence interval ranging from 134 to 145cM.

Regarding GY, the linkage group on 7D was identified as potentially interesting as it carried four QTL that were further grouped into one unique meta-QTL spanning a region from 15 to 41cM presumably including the *Vrn-D3* locus (Table 11.7 p. 109). This stable QTL for GY was found both under N1 and Np treatments.

No stable QTL could be identified for SEN probably because few QTL were found for this trait (Table 11.6 p. 107). Regarding ONSN, chromosome 2D carried four QTL detected in different environments and N treatments in particular (Table 11.7 p. 109). Meta-analysis grouped these QTL into one unique meta-QTL with a confidence interval ranging from 94 to 107 cM including the *Ppd-D1* locus. Regarding durTot, chromosome 2D carried potentially stable QTL as five QTL could be grouped into one unique meta-QTL with a confidence interval ranging from 94 to 108cM again including the *Ppd-D1* locus. Based on this analysis, the 2D chromosome was shown to be involved in determining durTot mainly by affecting ONSN.

Stable QTL for AGN₉₂ were found on the 2A2 and 2D linkage groups comprising two QTL each further grouped into one unique meta-QTL spanning a region from 0 to 5 cM and 93 to 110 cM, respectively (Table 11.7 p. 109). The stable QTL identified on the 2D chromosome for this trait includes the *Ppd-D1* gene. Finally, this analysis did not allow the identification of any co-location between stable QTL for GPC or GY and stable QTL for leaf senescence during grain filling.

TABLE 11.7 – Summary of putative stable QTL (*i.e.* QTL identified across different environments) identified using the Toisondor $\times$ CF9107 wheat mapping population grown in 10 environments for anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), grain yield (GY), above ground N at harvest (AGN₉₂), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling. Information displayed for each trait : the linkage group for which stable QTL were found, the number of environments where the QTL was found, the minimum and maximum values for individual R² (percentage of phenotypic variance explained by individual QTL) and additive effect of the CF9107 parent, the mean position and the closest marker to the stable QTL.
⁽¹⁾ Markers were mapped at the same position.

Trait	Linkage group	Number of environments	Individual R ² (%)	Additive Effect	Position (cM)	Closest Marker
AD	2A2	4	[3;6]	[-3;-2]	28	wPt-1657
	2D	10	[34;61]	[5;9]	101	Ppd-D1
	4A	4	[2;9]	[3;4]	23	wPt-0162
	4B1	4	[3;6]	[1;2]	0	wPt-8892
	7D	10	[6;14]	[-5;-3]	31	wPt-4115
GPC	2A2	7	[9;24]	[0;1]	2	wPt-9104
	3B2	5	[11;15]	[-1;0]	139	wPt-1940
GY	7D	4	[11;19]	[-126;-42]	28	wPt-4115
ONSEN	2D	4	[13;47]	[-64;-35]	101	Ppd-D1
durTot	2D	5	[10;50]	[-85;-29]	101	Ppd-D1
AGN ₉₂	2A2	2	[10;11]	[1;1]	0.8	wPt-6158 ; wPt-3565 ⁽¹⁾
	2D	2	[9;14]	[-1;2]	101	Ppd-D1

11.4.5 Pleiotropic QTL affecting leaf senescence during grain filling and GY or GPC : locations and analysis of their allelic effects

The 2A, 2D and 7D chromosomes showed putative pleiotropic QTL contributing to the phenotypic correlations between GPC and leaf senescence during grain filling (Table 11.8 p. 114, Fig. 11.3 p. 111, Fig. 11.4 p. 112, Fig. 11.5 p. 113).

On 2A, pleiotropic QTL affecting GPC and post-anthesis leaf senescence were found in cf.9.Np and ms.9.Nl.

In cf.9.Np, linkage group 2A2 showed co-location of QTL for GPC and ONSN in the vicinity of a QTL identified for AD that could be considered as independent clusters (Table 11.8 p. 114). Analysis of the allelic effects at these QTL (Fig. 11.3 p. 111) showed that a decrease of the days to anthesis (-2 days) due to the presence of the CF9107 allele was accompanied by an increase of ONSN of 24°Cdays and GPC (+ 0.4 points).

In ms.9.Nl, QTL for GPC was associated to QTL for durTot, AGN₉₂ and AD grouped into one unique cluster (Table 11.8 p. 114), although the most likely position of the QTL for AD was highly different (28 cM) from those of QTL for GPC (2cM), durTot (0cM) and AGN₉₂ (5cM). Analysis of the allelic effects (Fig. 11.3 p. 111) showed that the presence of the CF9107 allele decreased AD (-3 days) and increased GPC (+0.7 points), durTot (+20°C days) and AGN₉₂ (+0.5 g N m⁻²). Thus, this pleiotropic QTL on chromosome 2A contributes to the positive correlation found between GPC and post-anthesis leaf senescence in ms.9.Nl (Table 11.5 p. 105).

In ms.9.Np, a cluster of QTL detected for GPC, ONSN, durTot and AD was found on chromosome 2D (Table 11.8 p. 114). Analysis of the allelic effects (Fig. 11.4 p. 112) showed that the presence of the CF9107 allele delayed AD (+7 days), decreased GPC (-0.9 points), ONSN (-52°C days) and durTot (-59°C days). Thus, this pleiotropic QTL contributes to the positive correlation found between GPC and leaf senescence during grain filling in ms.9.Np (Table 11.5 p. 105).

In nw.9.Nl, co-location of QTL detected for GPC, ONSN, SEN and AD were found on chromosome 7D and formed a unique cluster (Table 11.8 p. 114). The presence of the CF9107 allele at this QTL was associated to a decrease in AD (-3 days) and ONSN (-84°C days; Fig 11.5 p. 113) and an increase in GPC (+0.9 points) and SEN (+81°C days). A QTL for GY was also found but its LOD score (2.83; data not shown) fall just below the threshold calculated for this trait × environment combination (2.89; data not shown).

The 2D and 7D chromosomes showed putative pleiotropic QTL contributing to the phenotypic correlations between GY and leaf senescence during grain filling (Table 11.8 p. 114, Fig. 11.4 p. 112, Fig. 11.5 p. 113).

A putative pleiotropic QTL on chromosome 2D including the *Ppd-D1* gene was found in cf.9.Np (Table 11.8 p. 114) delaying AD by 7 days and decreasing both GY (-63 g m⁻²), AGN₉₂ (-0.8 g N m⁻²), ONSN (-64 °Cdays), durTot (-58 °Cdays) (Fig. 11.4 p. 112). This putative pleiotropic QTL contributes to the positive correlation found between GY and leaf senescence during grain filling in this environment (Table 11.5 p. 105).

On chromosome 7D, a putative pleiotropic QTL affecting GY and leaf senescence was found in ms.9.Nl and nw.9.Np associated with a QTL for AD, presumably including the *Vrn-3* gene (Table 11.8 p. 114).

In ms.9.Nl, the presence of the CF9107 allele at this QTL was associated with a decrease in AD (5 days) and GY (-42 g m⁻²) and an increase in SEN and durTot (+28 and +48°C days, respectively ; Fig. 11.5 p. 113).

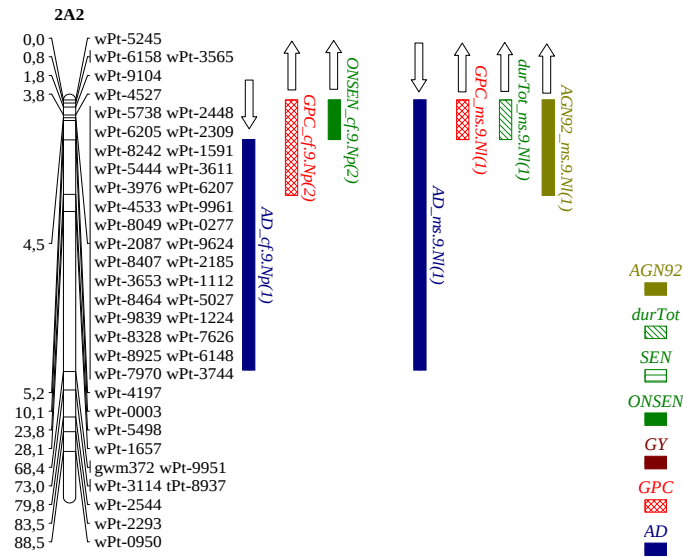


FIGURE 11.3 – Putative pleiotropic QTL found on the 2A chromosome for the Toisonдор × CF9107 mapping population determining anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), total above ground N at harvest (AGN92), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling. QTL were clustered using the Biomercator software. QTL identifiers correspond to the trait name followed by the name of the environment where it was detected and a number in brackets indicating to which cluster the QTL belongs. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95. The sign of the effect of the CF9107 allele is indicated by an arrow above each QTL (up : positive effect, down : negative effect).

In nw.9.Np, meta-analysis identified two clusters, one including QTL for GPC and durTot and one including QTL for AD, GY and ONSen (Table 11.8 p. 114). The effect of the CF9107 allele was associated with a decrease in AD (-4 days), durTot (-40°C days), GY (-126 g m⁻²) and ONSen (-36°C days ; Fig. 11.5 p. 113) and an increase in GPC (+0.7 points). Thus, these putative pleiotropic QTL contributed to the positive and negative phenotypic correlations observed between leaf senescence during grain filling and GPC or GY, respectively in this environment.

It is noteworthy that pleiotropic QTL found on 7D (around marker “wPt-4115”) had antagonistic effects on GY and GPC. The effects on GY and GPC of the putative pleiotropic QTL found on 7D, calculated for each environment, are shown in Fig. 11.6 p. 115. This chromosomal region might thus contribute to the genetic negative relationship between GPC and GY.

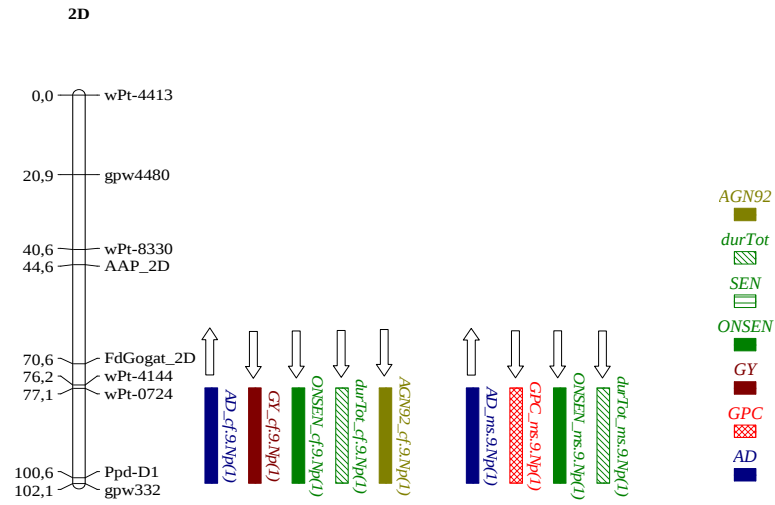


FIGURE 11.4 – Putative pleiotropic QTL found on the 2D chromosome for the Toisonдор $\times$ CF9107 mapping population determining anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), grain yield (GY), total above ground N at harvest (AGN92), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling. QTL were clustered using the Biomercator software. QTL identifiers correspond to the trait name followed by the name of the environment where it was detected and a number in brackets indicating to which cluster the QTL belongs. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95. The sign of the effect of the CF9107 allele is indicated by an arrow above each QTL (up : positive effect, down : negative effect).

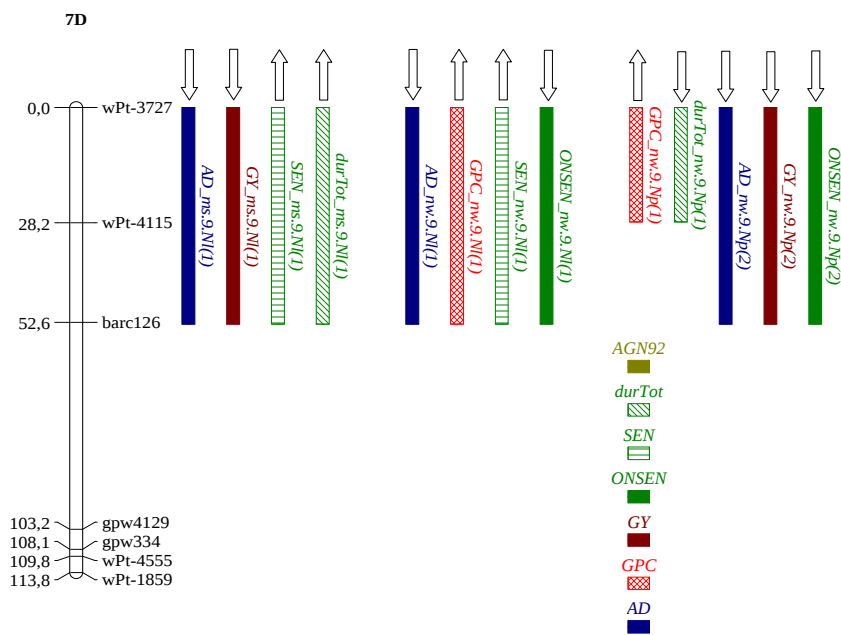


FIGURE 11.5 – Putative pleiotropic QTL found on the 7D chromosome for the Toisonдор $\times$ CF9107 mapping population determining anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), grain yield (GY), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling. QTL were clustered using the Biomercator software. QTL identifiers correspond to the trait name followed by the name of the environment where it was detected and a number in brackets indicating to which cluster the QTL belongs. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95. The sign of the effect of the CF9107 allele is indicated by an arrow above each QTL (up : positive effect, down : negative effect).

TABLE 11.8 – Summary of putative pleiotropic QTL determining anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), grain yield (GY), total above ground N at harvest (AGN₉₂), the date of the onset of the senescence phase (ONSEN), the duration of the senescence phase (SEN) and the total duration (durTot) of leaf senescence during grain filling identified using the Toisondor $\times$ CF9107 mapping population grown in 10 environments. QTL were clustered using the Biomercator software. Information displayed for each linkage group : the environment for which pleiotropic QTL were found, the cluster to which QTL belong, their position, the confidence interval of the cluster and the closest marker to the cluster.

Linkage group	Environment	Cluster	Trait	Position (cM)	Confidence interval	Closest Marker
2A2	cf.9.Np	1	GPC,ONSEN	0.69	0-5	wPt-6158 ; wPt-3565 ⁽¹⁾
		2	AD	28	10-68	wPt-1657
	ms.9.Nl	1	AD,GPC,durTot,AGN ₉₂	1.5	0-5	wPt-6158 ; wPt-3565 ⁽¹⁾
2D	cf.9.Np	1	AD,GPC,ONSEN,durTot,AGN ₉₂	100.6	94-107	Ppd-D1
	ms.9.Np	1	AD,GPC,ONSEN,durTot	101	94-107	Ppd-D1
7D	ms.9.Nl	1	AD,GY,SEN,durTot	28	15-41	wPt-4115
	nw.9.Nl	1	AD,GPC,SEN,ONSEN	28.2	15-41	wPt-4115
	nw.9.Np	1	GPC,durTot	0	0-10	wPt-3727
		2	AD,GY,ONSEN	28.2	13-43	wPt-4115

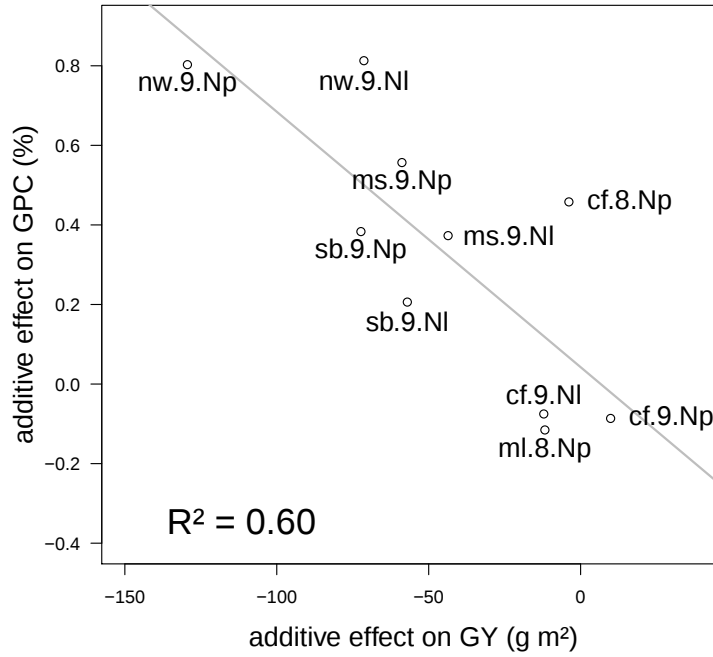


FIGURE 11.6 – Additive effects calculated of the CF9107 allele at the closest marker (“wPt-4115”) to the putative pleiotropic QTL detected on chromosome 7D for grain protein concentration (GPC) and grain yield (GY) for each environment. Environment abbreviations are given in Table 11.1 p. 95.

11.5 Discussion

In this study, analysis of QTL co-location for AD, GY, GPC and traits related to leaf senescence during grain-filling was carried out using the Toisondor $\times$ CF9107 wheat mapping population grown in 10 contrasting environments. This allowed the identification of stable QTL determining these traits consistently across environments and possible pleiotropic QTL contributing to the phenotypic correlations between leaf senescence and GY or GPC. These possible pleiotropic QTL were all associated with QTL for AD related to the *Ppd-D1* and, presumably, the *Vrn-3* genes. The effects of AD on leaf senescence during grain filling, the physiological processes potentially underlying the pleiotropic QTL found in this study, and the benefits of using stay-green properties to improve wheat cultivars, are discussed.

11.5.1 QTL detection and analysis of QTL co-locations

A total of 91 QTL for 65 trait $\times$ environment combinations were detected in this study. Stable QTL for AD, GY, GPC, AGN₉₂ and leaf senescence during grain filling were found (a stable QTL being defined as a QTL occurring in at least 30% of the environments studied). Among the stable QTL found for AD, those on chromosomes 2D and 7D appeared of particular interest as they co-located with other QTL found for GY, GPC or leaf senescence. The stable QTL on 2D includes the photoperiod sensitivity gene *Ppd-D1*, and the one on the 7D

presumably includes the *Vrn-3* gene linked to the SSR marker “barc126”, and involved in the vernalization pathway (Yan et al., 2006; Bonnin et al., 2008; Greenup et al., 2009).

Among the stable QTL for GPC found on 2A and 3B, the one on the 2A appeared to be the most interesting genomic region determining GPC as it was composed of seven QTL found in different environments and N treatments, and was associated with a stable QTL for AGN₉₂. Moreover, based on the most likely position of the QTL found in this region, this QTL for GPC appeared independent of AD and thus might be useful for increasing GPC and AGN₉₂ in elite pre-breeding material already closely optimized for AD. Other QTL analyses reported QTL for GPC on 2A (Groos et al., 2003; Prasad et al., 2003; Laperche et al., 2007), but the lack of common genetic markers between maps hampers concluding that these QTL are the same.

One stable QTL on 7D was found for GY, again co-locating with a major QTL for AD. A stable QTL for GY on 7D was reported by Groos et al. (2003), but again the lack of common genetic markers between maps hampers concluding that these QTL are the same.

A stable QTL on 2D was previously identified for leaf senescence during grain filling, and has been already reported in a Beaver × Soissons DH mapping population (Verma et al., 2004). It co-located with stable QTL for AD reflecting the major impact of flowering time genes on leaf senescence during grain filling which will be further discussed below.

Considering the low number of QTL found for SEN, it is questionable if genetic variability exists for this trait. ONSEN appeared more interesting from this point of view as it largely explained environment and genetic effects on GY or GPC (Fig. 11.2 p. 102, Table 11.5 p. 105).

Finally, no common stable QTL was found for leaf senescence and GPC or GY. This is in accordance with the strong $G \times E$ interactions observed on the relationship between these traits (Table 11.5 p. 105).

Analysis of QTL co-locations for GY, GPC and post-anthesis leaf senescence, environment by environment, allowed the identification of putative pleiotropic QTL (or closely linked QTL) affecting leaf senescence during grain filling and GY or GPC in some environments and thus resulting in the correlations observed at the phenotypic level between these traits in these environments.

However, the low number of environments where these pleiotropic QTL were detected suggests that genetic factors determining leaf senescence contribute moderately to GY or GPC in these agro-climatic conditions.

Moreover, among the three pleiotropic QTL affecting both leaf senescence during grain filling, and either GPC or GY, the ones on the 2D and 7D chromosomes appeared clearly to be in coincidence with stable QTL for AD, thus reflecting the strong impact of AD on the phenotypic correlations between leaf senescence during grain filling and GPC or GY. To some extent, this was also the case for the putative pleiotropic QTL found on 2A that was close to a QTL for AD, but the confidence intervals of these QTL did not completely overlap.

The genetic map used in this study possibly represents an incomplete coverage of the wheat genome as shown by its total length of 2,344 cM compared to the length of reference maps of the wheat genome (2,569cM in Somers et al. (2004), 3,522cM in Quarrie et al. (2005), 4,223 cM in Xue et al. (2008)). This may have led to some interesting QTL being missed or to bias the location and the confidence interval of the QTL if they were mapped on one side of a given linkage group.

11.5.2 Leaf senescence during grain filling is mainly driven by the timing of flowering in wheat populations segregating for major genes determining flowering time

Results of this study clearly showed that the genetic variability observed for leaf senescence during grain filling in this DH population was largely driven by the genetic variability existing for precocity (*i.e.* the timing of flowering). The strong association between post-anthesis leaf senescence and AD is highlighted by the co-location of stable QTL for these traits found on chromosomes 2D and 7D. A similar conclusion was drawn from a recent study on *Arabidopsis thaliana* in which co-location between QTL for leaf senescence and the FRI (Frigida) and FLC (Flowering Locus C) loci involved in the timing of flowering in this species were found (Wingler et al., 2010).

Furthermore, co-location between QTL for leaf senescence during grain filling and AD have been previously reported in wheat on the 2D and 3A chromosomes (Verma et al., 2004; Snape et al., 2007) and in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.; (Thomas and Howarth, 2000)). The aim of the present study was not to decipher the relationship between wheat precocity and senescence. Nevertheless four hypotheses can be drawn from the existing literature.

1. Wingler et al. (2010) suggested that precocity and leaf senescence in *A. thaliana* might be linked by the changes in the metabolism occurring soon after anthesis. By this hypothesis, the release of sugars in the leaves after anthesis, due to the dismantling of leaf structural components, and the remobilization of the resulting nutrients to the grain, could trigger senescence.

A putative effect of precocity on dry matter accumulation leading to increased level of soluble carbohydrates at anthesis in late cultivars would, therefore, hasten leaf senescence. The hypothesis may nevertheless be largely speculative and remains to be tested in wheat grown in agronomic conditions.

2. The mechanism linking precocity and leaf senescence during grain filling may also have an ecophysiological nature. Senescence kinetics is highly dependent upon environmental conditions such as water availability, temperature or N availability (see reviews by Thomas and Stoddart, 1980; Lim et al., 2007). Usually, under temperate climates, the environmental conditions experienced by a wheat crop during grain filling become increasingly stressful as soil resources (water and nutrients) become less available.

In this respect, the genetic variability for AD results in differences in the environment being perceived by a genotype. The range of variation for AD in the population studied here (15 days on average) was mainly due to the effect of *Ppd-D1*, and presumably *Vrn-3*, and appeared large enough to induce these strong $G \times E$ interactions. Further ecophysiological studies are needed to identify the possible factors involved.

3. Outside of the direct effects of these precocity induced $G \times E$ interactions on leaf senescence during grain filling, an indirect effect of AD on the partitioning of N uptake between the pre and post-anthesis period may affect leaf senescence.

Indeed, earlier flowering results in reduced pre-anthesis N uptake and hence indirectly enhances post-anthesis N uptake as deduced from the negative correlation between post-anthesis N uptake and total N at anthesis (Barbottin et al., 2005; Bogard et al., 2010). This redistribution of season-long N uptake towards the grain filling period may favour prolonged canopy survival of early genotypes.

4. Indirect effects of AD through plant structure might also be expected. In particular,

it has been shown that grain number in wheat is reduced in plants affected by N deficiency around anthesis (Demotes-Mainard et al., 1999; Martre et al., 2003).

As N fertilizer was applied on fixed dates in the present study, it is likely that the observed differences in AD led to genotype by timing of N fertilizer application interactions that subsequently affected the crop source : sink ratio. This is supported by the effect of AD on grain number per area and AGN₉₂ in this study. For monocarpic plants such as wheat, the onset of whole plant senescence is initiated by the developing sinks which remobilize nutrients from the vegetative tissues (Gan et al., 2007).

This process is therefore expected to be affected by the genetic variability existing for the mass ratio between vegetative parts and the developing kernels (*i.e.* the source : sink ratio). Following that, N remobilization is triggered by the demand of developing kernels, and it is reasonable to hypothesize that higher grain number per area might accelerate N remobilization and thus shorten leaf senescence duration during the grain filling period. Studies involving source :sink manipulations have clearly shown that source reduction accelerated senescence while sink reduction delayed senescence in different species including wheat (Mondal et al., 1978; Tollenaar and Daynard, 1982; Zhenlin et al., 1998; Rajcan and Tollenaar, 1999a).

Nevertheless, contradictory results may temper this suggestion, and calls for a more exhaustive understanding of the relationship between leaf senescence and crop source : sink ratio (Dreccer et al., 1997; Mi et al., 2000).

11.5.3 Physiological process underlying the relationship between leaf senescence during grain filling and GPC or GY in wheat

Analysis of QTL co-location allowed the identification of some putative pleiotropic QTL on the 2A, 2D and 7D chromosomes affecting leaf senescence during grain filling, AD, AGN₉₂ and GY or GPC in a few environments. The implication of AD in the relationship between post-anthesis leaf senescence and GY or GPC suggests the need to formulate a hypothesis taking into account the effect of the genetic variability for AD on the relationship between leaf senescence during grain filling and GY or GPC.

The positive effect of the pleiotropic QTL found on chromosomes 2A and 2D on GPC or GY was associated with a delay of ONSSEN. This was not the case for the pleiotropic QTL on chromosome 7D for which a more complex picture arose as increased ONSSEN affected GY and GPC antagonistically and thus contributed to the general GPC-GY negative relationship.

Thus, apart from 7D, a unique physiological mechanism might relate GPC and GY to leaf senescence during grain filling. The presence of QTL for AGN₉₂ found in ms.9.N1 and cf.9.Np on the 2A and 2D chromosomes, respectively, supports the assumption that longer senescence duration, by maintaining photosynthetic activity during grain filling, allows N acquisition to be maintained during the post-anthesis period (Mi et al., 2000; Borrell et al., 2001).

The differential effect of the pleiotropic QTL found on 2D and 7D on GPC and GY might be interpreted as a consequence of N availability during the post-anthesis period. Maintaining green leaf area during the post-anthesis period under low N availability is expected to maintain C assimilation but not N uptake. This would thus increase GY and lead to a higher dilution of grain proteins under low N compared to high N inputs.

This is in accordance with studies showing that limiting N conditions lead to a steeper slope of the GPC-GY (Simmonds, 1995; Triboï et al., 2006). However, this hypothesis must

be confirmed by quantifying precisely the N availability during the post-anthesis period that cannot be solely summarized by the quantity of N applied, as N stress situations can be experienced during the post-anthesis period even under high N treatment due to environmental factors limiting N uptake (*e.g.* drought).

11.5.4 Implications for breeding improved wheat cultivars

Different studies have been carried out on the genetics and physiology of senescence and its impact on GY in major crops such as sorghum (Borrell and Hammer, 2000), maize (*Zea Mays* L.) (Rajcan and Tollenaar, 1999a,b; Coque et al., 2008) and wheat (Verma et al., 2004; Snape et al., 2007; Vijayalakshmi et al., 2010).

In these studies, traits contributing to maintaining greenness during the post-anthesis period were associated with higher GY, particularly under N or water limiting conditions. However, negative correlations between “greenness” and GY have also been reported in rice (*Oryza* sp.) that is not expected following the underlying hypotheses relating stay-green phenotype to GY (Jiang et al., 2004).

In the present study, a delay of the onset of leaf senescence significantly increased GY under both low and high N treatments, on average, even if the effect under low N environments appeared moderate when looking at environments separately.

Regarding GPC, the present results would support a more cautious use of this trait since its relationship with leaf senescence during grain filling were highly prone to $G \times E$ interactions. Indeed, these correlations were not always significant and the direction of the effects differed between environments (Table 11.5 p. 105). This suggests that the use of leaf senescence as a selection criterion to improve GPC strongly depends on the targeted environments and presumably the N availability during the post-anthesis period.

Finally, the present results suggest that most of the variation observed for leaf senescence duration in this doubled haploid population results from precocity induced variations not related to senescence *per se*. In this respect, revealing the genetic determinism of leaf senescence during grain filling should explicitly take into account genetic variability for precocity in order to separate leaf senescence from precocity induced variation. This might be achieved by using mapping populations not segregating for major genes involved in plant development responses (Pinto et al., 2010).

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online. Results of QTL detection are publicly available at <http://urgi.versailles.inra.fr/GnpMap/mapping/welcome.do>

Table 11.2 p. 100. GPC-GY relationships in the different environments studied.

Table 11.4 p. 103. Analysis of variance based on the controls for the different traits on which this study focuses.

Funding This work was supported by the “NUE traits” project [IN-BB-06] funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC).

11.5.5 Acknowledgements

The authors acknowledge the experimental work carried out by Olivier Gardet and Stéphane Gilles (INRA, Le Moulon), Florence Exbrayat-Vinson, Joëlle Messaoud, Jean-Louis

Joseph and Pascal Lemaire (INRA, Clermont-Ferrand), Dominique Brasseur (INRA, Estrées-Mons), Catherine Baker and Luzie Wingen (John Innes Center, Norwich) and Robert Purdew (University of Nottingham).

Sixième partie

Identification de régions
chromosomiques permettant
d'augmenter la teneur en protéines
indépendamment du rendement en
grains chez le blé

Un troisième article rapporte une détection de QTL pour la date de floraison, le rendement en grains, la teneur en protéines et le GPD réalisée à partir de données obtenues sur trois populations de cartographies connectées selon un plan de croisement de type demi-diallèle expérimentées au sein d'un large réseau incluant différentes combinaisons lieu×année×traitement azoté. Initialement, ces données devaient être analysées en utilisant le logiciel MCQTL (Jourjon et al., 2005) afin de tirer partie de la connexion de ces trois populations. Ce type d'analyse a déjà été réalisé chez d'autres espèces (Blanc et al., 2006; Billotte et al., 2010) mais pas encore chez le blé, ce qui aurait pu constituer un élément d'originalité de l'étude. Des problèmes liés à MCQTL ont été rencontrés pour certaines combinaisons caractère×environnement. Plutôt que de présenter des résultats partiels, il a été choisi d'analyser séparément les trois populations puis de réaliser une méta-analyse des QTL comme cela a déjà été effectué pour la date de floraison chez le blé (Hanocq et al., 2007; Griffiths et al., 2009).

En dépit de l'application d'une technique d'analyse différente, l'objectif de cette étude reste le même et consiste à mettre en évidence des régions chromosomiques affectant indépendamment la teneur en protéines et le rendement en grains. Les résultats font apparaître que

1. Du fait de la faible corrélation entre teneur en protéines et rendement en grains observée pour les différentes combinaisons population×environnement, l'utilisation du GPD en détection de QTL n'apporte pas de valeur ajoutée comparée à l'utilisation de la teneur en protéines seule car les positions et les effets des QTL identifiés pour ces deux caractères sont identiques.
2. Trois régions situées sur les chromosomes 2A, 3B et 7D affectent de manière robuste la teneur en protéines.
3. Les QTL de teneur en protéines détectés sur les chromosomes 2A et 7D sont fréquemment associés à des QTL de rendement en grains. Ces régions sont donc susceptibles de contribuer de manière significative à la relation teneur en protéines - rendement en grains.
4. La région du 3B n'ayant été identifiée que pour une seule population, son effet sur la teneur en protéines semble dépendre du fond génétique.
5. La région du 2A, bien qu'elle contribue pour une population à la relation teneur en protéines - rendement en grains, semble être la plus intéressante pour améliorer la teneur en protéines indépendamment du rendement en grains du fait de sa stabilité et de son indépendance vis-à-vis de la date de floraison.

Dès que les problèmes rencontrés lors de l'utilisation de MCQTL auront été résolus, ces données devront être ré-analysées et cet article modifié afin d'être soumis à un journal tel que *"Theoretical and Applied Genetics"*.

Chapitre 12

Using connected populations to identify genomic regions to improve grain protein concentration independently of grain yield in winter wheat

Running title :

Connected populations to identify genomic regions to improve grain protein concentration.

Authors :

Matthieu Bogard^{1,2}, Vincent Allard^{1,2}, Pierre Martre^{1,2}, Emmanuel Heumez³, John W. Snape⁴, Simon Griffiths⁴, Oorbessy Gaju⁵, John Foulkes⁵, Jacques Le Gouis^{1,2,*}

1 INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 234 Avenue du Brézet, F-63 100 Clermont-Ferrand, France

2 Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, F-63 177 Aubière Cedex, France

3 INRA, UMR 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés, Estrées-Mons, F-80 203 Péronne, France

4 Crop Genetics Department, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK

5 Division of Agricultural Sciences, University of Nottingham, Leicestershire LE12 5RD, UK

* **Corresponding author** : Jacques Le Gouis

Email : Jacques.Legouis@clermont.inra.fr

Address : INRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales. 234 Avenue du Brézet, F-63 100 Clermont-Ferrand, France

Phone : +33 4 73 62 43 11

Fax : +33 4 73 62 44 53

Date of submission : *no yet submitted... in progress...*

Number of Figures : 4

Number of tables : 4

Abbreviations :

AD, anthesis date; GPC, grain protein concentration; GPD, grain protein deviation; $G \times E$, genotype by environment; GY, grain yield; QTL, quantitative trait loci.

12.1 Abstract

Grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) are two major traits contributing to the economic value of the wheat crop. These are consequently major targets in wheat breeding programs but their simultaneous improvement is hampered due to the long known genetic negative GPC-GY relationship. It has been shown that the deviation to this relationship (“Grain Protein Deviation” or GPD) has a genetic basis, is mainly related to post-anthesis N uptake and would be valuable in order to shift this negative relationship.

Therefore, knowing the genetic determinants of GPD through QTL analysis appears to be useful in order to possibly use marker assisted selection to improve GPC without reducing GY. With this end in view, QTL detection was carried out for anthesis date (AD), GY, GPC and GPD using three connected double haploid populations grown in a large multi-environment trial network.

Results show that, due to the low GPC-GY relationships, correlations between GPC and GPD were high and thus QTL analysis for these traits gave nearly the same results in terms of locations and effects. The most interesting genomic regions determining GPC or GPD were located on the 2A, 3B and 7D chromosomes, the latter being associated to a stable QTL for AD, presumably related to the vernalization *VRN-D3* gene. The region on the 3B determining GPC was detected in only one population, suggesting that its effect depends on the genetic background. The QTL for GPC on the 2A and 7D were found on two populations and were frequently associated to QTL for GY, thus showing these regions contributes to the GPC-GY relationship. However, the 2A region appeared more interesting to improve GPC as it was independent of AD, and contributed less to the GPC-GY relationship.

Keywords : Diallel, Grain protein concentration, grain protein deviation, grain yield, QTL, *Triticum aestivum* L.

12.2 Introduction

Grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) are major traits in wheat as they largely determine wheat productivity and quality (Shewry, 2009; Oury et al., 2010). GY is the main trait on which wheat breeding programs focuses. However, due to the long known genetic negative relationship between GY and GPC, breeding has resulted in increasing GY to the expense of GPC (Oury et al., 2003).

Monaghan et al. (2001) have suggested using the deviation from the regression line between GY and GPC called “grain protein deviation” (GPD) in order to identify genotypes with higher GPC than expected by their GY. Oury and Godin (2007) and Marinciu and Săulescu (2008) showed that GPD has a genetic basis by comparing varietal sets in large experimental networks. Bogard et al. (2010) later showed that it is mainly related to genetic

variability for physiological traits affecting post-anthesis N uptake independently of anthesis date (AD) and total above ground N at anthesis.

Since QTL analysis has been facilitated by the use of molecular markers and proper statistical methods (reviewed in [Kearsey and Farquhar, 1998](#)), QTL mapping in plants has been generally carried out using bi-parental mapping populations. However, these populations only partially reflect the genetic variability existing in the gene pool for a given trait. The use of several populations derived from diverse parental material not only increases the probability that a QTL will be polymorphic in at least one population but also provides insights into the available genetic variability that might be used in breeding and thus a better understanding of the genetic architecture of the phenotype ([Verhoeven et al., 2005](#); [Holland, 2007](#)). It has been shown that the use of multiple line crosses is a powerful approach to map QTL and this strategy has been applied in various plant and animal species ([Rebai et al., 1997](#); [Jourjon et al., 2005](#); [Blanc et al., 2006](#); [Pierre et al., 2008](#); [Billotte et al., 2010](#)).

Different tools are available to carry out QTL detection using multiple line crosses. One of these is the MCQTL software ([Jourjon et al., 2005](#)) which enables to perform linear regression in multi-cross designs and that has already been used in *Medicago truncatula* ([Pierre et al., 2008](#)) and oil palm ([Billotte et al., 2010](#)). Another approach may be based on QTL meta-analysis ([Goffinet and Gerber, 2000](#)) where QTL are detected on each population independently and then combined together. This approach was already used in different studies on wheat in particular ([Hanocq et al., 2007](#); [Laperche et al., 2007](#); [Griffiths et al., 2009](#); [Gegas et al., 2010](#)) but not for grain protein concentration neither on connected populations.

Marker assisted selection (MAS) has been proposed as an efficient tool to complement conventional breeding programs and has already been practiced to improve wheat quality or resistance to biotic stress in several parts of the world ([Gupta et al., 1999](#); [Dubcovsky, 2004](#)). This technology is based upon the identification, through marker-trait association studies (QTL analysis, association genetics), of genetic markers linked to genomic regions determining the trait of interest.

Genetic markers usable in MAS should have some desirable features. In particular, such markers should be closely linked to genes of interest to avoid introgression of undesirable characteristics and identified on adapted germplasm to be of practical value in breeding of elite material. Moreover, as MAS might be an expensive technology despite the recent deployment of high-throughput molecular marker technology in wheat (*e.g.* SNP, DArT® platforms), markers linked to stable QTL (*i.e.* identified across different experimental conditions) should be preferably selected in order to maximize the benefits of using MAS.

So far, most of the marker-trait association studies carried out by QTL analysis have been based on the use of bi-parental populations, leading to the exploitation of a limited genetic diversity to identify loci possibly useful in MAS. The use of connected populations, “multiparent advanced generation intercross” ([Varshney and Dubey, 2009](#)) or QTL meta-analysis ([Goffinet and Gerber, 2000](#)) might partially solve this problem and help to validate QTL identified using bi-parental populations. MAS has already been successfully used to increase GPC through the introgression of the *GPC-B1* QTL for high grain protein content ([Chee et al., 2001](#); [Uauy et al., 2006](#); [Sherman et al., 2008](#)).

The objectives of the present study were :

1. to identify QTL determining GY, GPC and GPD
2. to determine QTL affecting both GPC and GY and those affecting these traits separately
3. to suggest genomic regions surrounded by molecular markers that could be used in molecular-assisted breeding to improve GPC without reducing GY.

12.3 Materials and methods

12.3.1 Plant material and Field experiments

Plant material used in this study consisted in three double-haploid mapping populations from the crosses Toisonдор $\times$ Quebon (TORQUE), CF9107 $\times$ Quebon (CFQUE) and Toisonдор $\times$ CF9107 (TOR107). These three populations were grown in a multi-environment trial network (MET) comprising three locations in France and in the UK, two years (2008, 2009) and two N treatments (Nl, low N; Np, potential N) resulting in seven location $\times$ year $\times$ N treatment combinations referred hereafter as different environments (Table 12.1 p. 129).

The first field experiment carried out at Clermont-Ferrand in 2008 under high N input (abbreviated as cf.8.Np) consisted in a first evaluation of the plant material so the number of genotypes grown for each population was higher than in the other environments : 316 genotypes for CFQUE population, 230 for TORQUE and 143 for TOR107. In the other environments, 80 genotypes were grown for the CFQUE and TORQUE populations while 140 genotypes were grown for TOR107.

These genotypes were chosen at random after eliminating those having lodged or showing low seed purity based on the results obtained from the previous year experiment. More lines were chosen in the TOR107 population as a related study on the relationship between grain protein concentration, grain yield and leaf senescence during grain filling was carried out using this population (Bogard et al. submitted).

Two N treatments were applied at each site in 2008-2009 : a potential N treatment (Np) intended to replicate local commercial practice and a low N treatment (Nl) with N supply corresponding to 20 - 50% of the potential N treatment (Table 12.1 p. 129). In each location, 50 to 60 kg N ha⁻¹ were applied around the end of tillering (Zadok's stage GS25; (Zadoks et al., 1974)) for both N treatments. For the Np treatment, 60 to 190 kg N ha⁻¹ were applied in two equal split applications during stem elongation (between GS31 and GS 32) and between flag leaf tip appearance (GS37) and male meiosis (GS39). Each split was applied on the same calendar date for all genotypes.

For each population, field experiments were arranged in an incomplete block design with two blocks each representing an N treatment. The blocks were divided each in eight sub-blocks with four sub-blocks devoted to TOR107 and two for each of the TORQUE and CFQUE populations. Lines were randomly arranged within each sub-block that comprised 50 plots with Toisonдор, CF9107 and Quebon as controls. For each population, a subset of DHL was grown twice in two different sub-blocks. Each sub-block contained a subset of 23 DHL among the ones only present once and 24 DHL among the ones repeated twice. Sowing densities was set up to reach about 250 plants m⁻² after winter. When necessary, fungicides, insecticides and herbicides were applied to achieve optimal management of the crop.

TABLE 12.1 – Characteristics of the environments studied : name of the locations, coordinates (a.s.l, « above sea level »), plot size, harvest year of the experiments. Cumulative rainfall, average daily air temperature and number of days with maximum daily air temperature above 25°C (Ndays25) were calculated between the 1st of June and the 1st of August of the harvest year, roughly corresponding to the period between anthesis and physiological maturity. Soil N at the end of winter (from 0cm to -90cm depth), total N fertilizer supplied during the experiments (N fertilizer was applied using split applications as described in the « Materials & Methods » section) and environment’s abbreviations are given.

Location	Coordinates	Plot size (m)	Harvest year	Cumulative rainfall (mm)	Average daily air temperature (°C)	Ndays25	Mineral soil N (kg N ha ⁻¹)	N fertilizer (kg N ha ⁻¹)	Environment abbreviation
Clermont-Ferrand	45°78' N	1.5 × 5	2008	183	18	28	115	180	cf.8.Np
	3°08' E		2009	151	19	28	75	50	cf.9.Nl
	401 m a.s.l							200	cf.9.Np
Norwich	52°63' N 1°30' E 14 m a.s.l	1.5 × 4	2009	195	15	1	35	50 200	nw.9.Nl nw.9.Np
Sutton-Bonington	52°82' N 1°25' W 38 m a.s.l	1.65 × 5	2009	157	16	5	23	60 240	sb.9.Nl sb.9.Np

12.3.2 Phenotyping

Anthesis dates (AD; day of the year; DOY) were recorded when 50% of the spikes carried visible stamens (GS61) on the TOR107 population (all environments) but only in Norwich in 2009 at low and high N inputs (nw.9.Nl and nw.9.Np) for the TORQUE and CFQUE. All plots of the trials were harvested with a combine harvester to measure grain yield (GY, g m⁻²). NIRS was used to assess grain protein concentration (GPC, %) on whole grains. All values were adjusted to 0% moisture content.

Mean values for AD, GY and GPC across Np, Nl treatments or across all the environments were calculated for each population and were analysed as separate environments named hereafter as Np, Nl or “mean”. GPD was calculated as the residuals of the regression of GPC over GY for each population within each environment, within each N treatment (using mean GPC and mean GY per N treatment) and using mean GY and mean GPC obtained across all the dataset. Genotyping

12.3.3 Genotyping

140 genotypes from the TOR107, 91 from the TORQUE and 90 from the CFQUE populations were typed. Genomic DNA was extracted from leaves frozen and grounded in liquid N using the Qiagen Biosprint plant DNA kit (Qiagen, USA). DNA concentration was then adjusted to 100ng.μL⁻¹ using a microlab Star robot (Hamilton, USA). DArT® typing was obtained from the Diversity Arrays Technology Pty Ltd Company (<http://www.triticarte.com.au>) by sending 30μL of DNA solution. Genomic DNA of the parents and doubled-haploid lines were hybridised to the wheat DArT® array v2.3 and polymorphisms were detected and scored as described by Akbari et al. (2006).

SSR markers were chosen in order to complete the DArT® typing of the D genome in particular. SSR typing was done using the following protocol except for the photoperiod sensitivity *PPD-D1* gene that was typed according to Beales et al. (2007).

A 8μL PCR reaction containing 1x PCR buffer (Qiagen, USA), 0.2mM dNTP, 0.5mM of primer mix (2.5μM forward primer and 25μM reverse primer), 0.5μM of M13 tag with one of the four fluorescent dyes (6-FAM, VIC, NED and PET), 0.03 unit Taq DNA polymerase (Qiagen, USA) and 60ng genomic DNA was used to perform all PCR reactions in a Veriti 384 well thermocycler™ (Applied Biosystem, USA). Cycling consisted in one step of denaturation at 94°C for 10min followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min with a final extension step of 72°C for 5 min and 4°C indefinitely. 5μL of PCR products were then diluted in 190μL ultrapure water and PCR products amplified with different fluorescent dyes were then multiplexed to a final volume of 7μL including 2μL DNA, 12pL GeneScan™-500 LIZ® size standard (Applied Biosystem, USA) and Hi-di™ formamide (Applied Biosystem, USA) *quantum satis*.

Mixed PCR products were denatured at 94°C for 5 min then chilled on ice. Amplified PCR products were then separated by capillary electrophoresis using the ABI 3730xl DNA Analyser and separated fragments were analysed using the GeneMapper™ software v3.7 (Applied Biosystem, USA) following the manufacturer’s instructions.

Single nucleotide polymorphism (SNP) typing was done using a set of 384 sequence polymorphisms discovered in a panel of 16 hexaploid wheat lines. SNPs were genotyped on the TOR107 population only using the Illumina Golden Gate technology (Akhunov et al., 2009) as previously described (Oliphant et al., 2002). Genotyping reactions were carried out using 150 ng of genomic DNA per line according to the manufacturer’s instructions.

12.3.4 Genetic mapping

The genetic map used in this study was obtained using 700 unique polymorphic markers comprising 406 DArT®, 49 SSR and 45 SNP markers and one specific marker for the *PPD-D1* gene. The map was generated using the CARTHAGENE v1.0 software with Haldane distance (De Givry et al., 2005). A genotyping matrix was created for each population and then merged using the “merge” command in CARTHAGENE. First, linkage groups were defined using the “group” command with $\text{LOD} \geq 3$ and genetic distance $\leq 30\text{cM}$. Marker order was then defined by flipping markers and choosing the best order.

Although DArT® markers are highly clustered (Francki et al., 2009) and markers inside a cluster do not bring any additional information for QTL analysis, all DArT® markers were kept in order to facilitate subsequent comparative studies across populations by meta-analysis. When two linkage groups corresponded to the same chromosome, a number was added at the end of the chromosome name (*e.g.* 2A1, 2A2).

12.3.5 QTL detection

QTL analysis was carried out using the Rqtl package (Broman et al., 2003) for all trait×population×environment combinations. First, QTL detection was carried out using simple interval mapping (SIM). LOD genome wise thresholds were determined for each of the 110 population×trait×environment combinations using 1000 permutations and by taking the 95 percentile LOD score as threshold.

QTL detection was then refined using composite interval mapping (CIM) introducing the QTL identified by simple interval mapping as covariates and discarding potential marker covariates surrounding the position of interest in a 40cM window. LOD thresholds for CIM were determined on 1000 permutations for each of the 110 population×trait×environment combinations. The extended Haley and Knott regression method was used both for SIM and CIM (Feenstra et al., 2006). The confidence interval of the QTL was based on a LOD-1 drop off (Manichaikul et al., 2006).

12.3.6 Analysis of QTL co-location

Analysis of QTL co-location was carried out using the Biomercator v2.1 software (Arcade et al., 2004). This software allows QTL meta-analysis to be performed based on the theory developed by Goffinet and Gerber (2000) who showed that it is robust enough to handle data collected on non independent experiments (*i.e.* obtained on a unique mapping population grown in different environments). Biomercator allows choosing the best among k models ($k = 1, \dots, n$) describing the number of QTL clusters on a given linkage group.

This analysis was done in order to cluster QTL for different traits rather than to obtain an assessment of the meta-QTL confidence interval. This allowed the identification of potentially stable (*i.e.* identified across different environments or different populations) or pleiotropic QTL having an effect on both grain protein concentration and grain yield. Meta-QTL analysis was carried out for each linkage group carrying at least five QTL for GPC whatever the population or the environment where these QTL were detected.

12.3.7 Statistics

The equality of the slopes of the linear regressions between GPC and GY calculated for each population or each N treatment for a given population was tested using N treatment

or population as covariates in the following model :

$$GPC_{ijk} = a + b_1 \times GY_{ijk} + b_2 \times cov + b_3 \times GY_{ijk} \times cov + \varepsilon_{ijk}$$

Where GPC_{ijk} is the grain protein concentration of genotype i in environment j for cross k ; a is the intercept, GY_{ijk} is the grain yield of genotype i in environment j for cross k ; cov is either N treatment or population (factorial); b_1 is the slope of the GPC-GY relationship, b_2 is the covariable effect and b_3 is the interaction effect between cov and GY_{ijk} and ε_{ijk} is the residual variance. The slopes were not considered as statistically different between N treatments or populations if the p-value of the b_3 coefficient was above 0.05.

Analysis of variance was used to test for genetic, environment and cross effect (genetic background) using the following model :

$$X_{ijk} = \mu + C_k + E_j + G_i(C_k) + C_k \times E_j + \varepsilon_{ijk}$$

Where, X_{ijk} is the value for a given trait of the i^{th} genotype in the j^{th} environment for cross k ; μ is the general mean, C_k is the effect of cross k , E_j is the effect of environment j ; $G_i(C_k)$ is the effect of line i in cross k ; $C_k \times E_j$ is the interaction between cross k and environment j and ε_{ijk} is the residual variance.

All the statistics and the graphics were performed using Rv2.11.1 ([R Development Core Team, 2008](#)) except graphics representing QTL confidence intervals on the genetic map obtained from the MapChart v2.2 software ([Voorrips, 2002](#)).

12.4 Results and discussion

12.4.1 Phenotypic variation

Table [12.2](#) p. [133](#) summarizes the phenotypic data for AD, GY and GPC for each population within each environment. For all traits and all environments, the range of variation of the DH lines of each cross was higher than the difference between the parents. This showed that transgressive segregations were observed for all traits analysed suggesting that different favourable alleles are present in each parent.

TABLE 12.2 – Descriptive statistics on grain yield (GY), grain protein concentration (GPC) and anthesis date (AD) for the three mapping populations used in this study. Mean values for the three parents of the populations are presented (CF9107, CF ; QUEBON, QUE ; TOISONDOR, TOI). Means for each population $\times$ environment combinations are associated with minimum and maximum values in brackets. Environment abbreviations are given in Table 12.1 p. 129.

Environment	Population	Grain yield				Grain protein concentration				Anthesis date			
		CF	QUE	TOI	Range	CF	QUE	TOI	Range	CF	QUE	TOI	Range
cf.8.Np	CFQUE	868	938	946	842 [604 ; 1007]	13.67	13.71	12.59	13.92 [11.91 ; 17.26]	143	149	147	NA
	TOR107				879 [624 ; 1140]				12.36 [10.36 ; 15.69]				148 [141 ; 155]
	TORQUE				927 [583 ; 1176]				12.74 [9.81 ; 16.77]				NA
cf.9.Nl	CFQUE	482	569	470	543 [423 ; 651]	7.59	8.03	7.13	7.84 [6.8 ; 9.04]	148	151	149	NA
	TOR107				547 [443 ; 663]				7.7 [6.25 ; 9.37]				150 [145 ; 156]
	TORQUE				590 [451 ; 663]				7.92 [6.75 ; 9.43]				NA
cf.9.Np	CFQUE	623	709	549	644 [514 ; 748]	10.16	10.25	8.99	10.3 [8.52 ; 11.89]	148	151	149	NA
	TOR107				641 [455 ; 774]				9.94 [8.8 ; 11.45]				150 [144 ; 156]
	TORQUE				702 [548 ; 836]				10.51 [8.71 ; 11.95]				NA
nw.9.Nl	CFQUE	592	693	630	634 [518 ; 751]	9.36	9.59	8.10	8.97 [7.03 ; 11.11]	152	153	152	152 [149 ; 157]
	TOR107				655 [445 ; 951]				7.92 [5.43 ; 11.19]				153 [147 ; 162]
	TORQUE				643 [463 ; 809]				8.59 [6.93 ; 11.24]				153 [148 ; 161]
nw.9.Np	CFQUE	812	965	800	866 [730 ; 1031]	14.22	14.33	11.99	13.85 [11.78 ; 16.49]	151	155	155	153 [150 ; 161]
	TOR107				889 [623 ; 1154]				12.19 [9.31 ; 15.17]				155 [147 ; 165]
	TORQUE				855 [688 ; 1016]				12.8 [10.38 ; 16.19]				154 [150 ; 164]
sb.9.Np	CFQUE	908	970	761	847 [543 ; 1266]	13.55	13.02	12.56	12.89 [11.34 ; 14.84]	151	154	152	NA
	TOR107				862 [487 ; 1152]				12.44 [10.03 ; 15.19]				154 [144 ; 163]
	TORQUE				873 [611 ; 1129]				12.63 [10.87 ; 14.46]				NA
sb.9.Nl	CFQUE	508	544	598	538 [316 ; 804]	8.69	9.12	8.57	8.62 [7.52 ; 10.67]	152	155	156	NA
	TOR107				492 [248 ; 688]				8.39 [6.94 ; 9.78]				156 [144 ; 164]
	TORQUE				594 [308 ; 894]				8.84 [7.58 ; 10.08]				NA

Table 12.3 p. 136 shows parameters of the linear regressions between GPC and GY for each population×environment combinations. We observed a significant negative GPC-GY relationship in 17 out of 21 population×environment combinations with high variability for the correlation coefficients and slopes (r ranging from -0.64 to +0.11 and slope ranging from $-0.009\% \text{ g}^{-1} \text{ m}^2$ to $+0.001\% \text{ g}^{-1} \text{ m}^2$). Correlation coefficients of the GPC-GY relationship calculated per population within each N treatment were all significant (r ranging from -0.55 to -0.24) and the slope was not significantly different between N treatments in any of the population studied. Finally, correlation coefficients of the GPC-GY relationship calculated *per* population showed that it was not significantly different between the TORQUE and CFQUE populations but significantly lower for the TOR107 population (Figure 12.1 p. 134).

Analysis of variance showed that genotypic, environment and genetic background effects were significant for GPC and GY (data not shown). Mean performances for both GY and GPC were lower for TOR107 compared to the other populations.

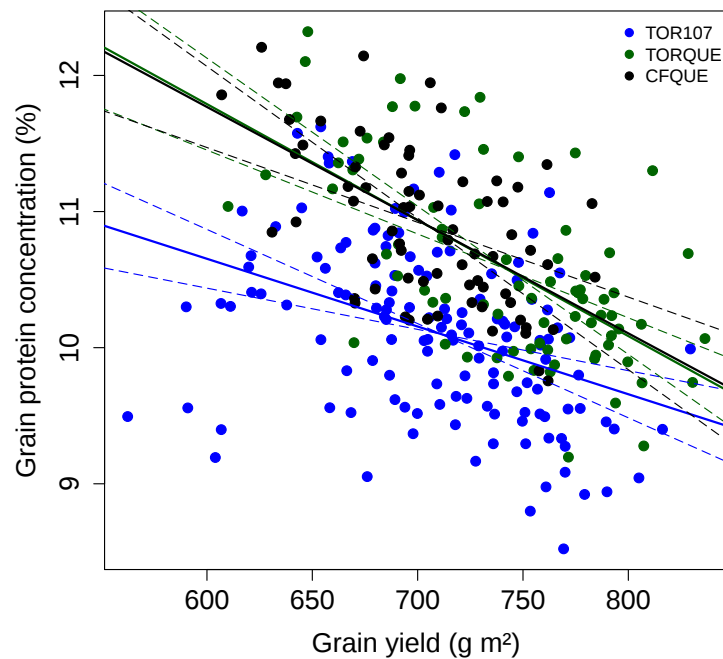


FIGURE 12.1 – The negative grain protein concentration - grain yield relationship calculated for each of the three mapping populations used in this study (Toisonдор × CF9107, TOR107; Toisonдор × Quebon, TORQUE; CF9107 × Quebon, CFQUE). The slope confidence intervals are shown as dashed lines. Values are means across all the environments studied for each line within each population.

12.4.2 Genetic map

A set of 745 polymorphic markers were typed across all the three mapping populations used in this study. 473 polymorphic markers were typed on the TORQUE population, 500 on the TOR107 and 359 on the CFQUE population. Thirty-seven markers were common to all populations among which seven were DArT® and 30 were SSR, suggesting three different alleles are present for these markers. 242 markers were common between the TOR107 and

TORQUE populations (including the *PPD-D1* gene), 139 were common between TORQUE and CFQUE and 132 were common between TOR107 and CFQUE. The genetic map used in this study contained 696 markers (49 markers were discarded as these could not be linked).

Its total length was 2510cM with 34 linkage groups representing the 21 wheat chromosomes and an average length of 74cM *per* linkage group. The average interval between consecutive markers was 6cM after removing clustered DArT® markers (*i.e.* markers mapped on the same location that do not bring any additional information for QTL detection). The homoeologous group 4 appeared to be under-represented with only 34 markers compared to the 110 markers mapped on average for other homoeologous groups. The D genome was the less represented with only 86 markers compared to the 280 markers on the A genome and the 330 markers on the B genome.

Therefore, the genetic map used in this study possibly represents an incomplete coverage of the wheat genome as shown by its total length of 2,510 cM compared to the length of reference maps of the wheat genome (*e.g.* 3 522cM in [Quarrie et al. \(2005\)](#), 4 223 cM in [Xue et al. \(2008\)](#)). This may have led to some QTL being missed, particularly on the homoeologous group 4, or to bias the location and confidence interval of a QTL if mapped on one end of a given linkage group.

12.4.3 QTL detection for AD, GY, GPC and GPD

QTL analysis for AD, GY, GPC and GPD was carried out separately on the three wheat connected mapping populations (half-diallel design) grown in a large multi-environment trial network comprising different locations, year and N treatments. QTL detection was carried out

1. for each environment separately
2. using mean values for each N treatment
3. using mean values across all environments.

A total of 166 QTL were detected in this study (Table 12.4 p. 137). Fifty-six QTL were found for AD (r^2 ranging from 1.7 to 68.6%), 29 for GY (r^2 ranging from 7.6 to 29.0%), 45 for GPC (r^2 ranging from 7.7 to 42.2%) and 36 for GPD (r^2 ranging from 7.5 to 27.6%). Considering mean values across N treatments, 14 QTL were detected at N1 and 20 at Np. No QTL were found, neither for GPD in sb.9. nor for GY using means values across the potential N treatment. The lower number of QTL found at low N input has already been observed in other studies on wheat ([Laperche et al., 2007](#)) and maize ([Bertin and Gallais, 2000](#)). The main hypothesis is linked to a lower heritability at low N levels due to either a higher environmental error and/or a lower genetic variance ([Leflon et al., 2005](#); [Laperche et al., 2006](#)).

TABLE 12.3 – Intercepts, slopes, correlation coefficients and p-values for the grain protein concentration-grain yield (GPC-GY) relationship for the three mapping populations in the different environments studied. Values in bold highlight population $\times$ environment combinations for which the GPC-GY relationship was significant. Nl and Np represent values obtained using mean GY and GPC for the low and potential N treatments, respectively and mean represents the GPC-GY relationship calculated using mean values across the whole dataset for GY and GPC. Environment abbreviations are given in Table 12.1 p. 129.

Environment	Population	Intercept	slope	Correlation coefficient	p-value
cf.8.Np	CFQUE	20.61	-0.0079	-0.57	0.00
	TOR107	14.59	-0.0026	-0.23	0.01
	TORQUE	19.48	-0.0073	-0.64	0.00
cf.9.Nl	CFQUE	8.16	-0.0006	-0.05	0.69
	TOR107	7.61	0.0002	0.01	0.88
	TORQUE	10.92	-0.0050	-0.37	0.00
cf.9.Np	CFQUE	13.47	-0.0049	-0.29	0.01
	TOR107	11.13	-0.0018	-0.23	0.01
	TORQUE	9.75	0.0011	0.11	0.34
nw.9.Nl	CFQUE	13.67	-0.0074	-0.47	0.00
	TOR107	7.27	0.0010	0.09	0.28
	TORQUE	13.82	-0.0082	-0.61	0.00
nw.9.Np	CFQUE	20.72	-0.0079	-0.45	0.00
	TOR107	15.73	-0.0040	-0.32	0.00
	TORQUE	20.66	-0.0092	-0.59	0.00
sb.9.Np	CFQUE	15.57	-0.0032	-0.44	0.00
	TOR107	14.14	-0.0020	-0.3	0.00
	TORQUE	14.56	-0.0022	-0.31	0.00
sb.9.Nl	CFQUE	9.67	-0.0020	-0.39	0.00
	TOR107	9.83	-0.0030	-0.41	0.00
	TORQUE	9.61	-0.0013	-0.31	0.00
Nl	CFQUE	11.23	-0.0048	-0.45	0.00
	TOR107	9.66	-0.0030	-0.29	0.00
	TORQUE	11.62	-0.0052	-0.55	0.00
Np	CFQUE	15.88	-0.0045	-0.33	0.00
	TOR107	13.70	-0.0027	-0.24	0.00
	TORQUE	15.00	-0.0037	-0.27	0.01
mean	CFQUE	16.26	-0.0076	-0.52	0.00
	TOR107	13.50	-0.0048	-0.38	0.00
	TORQUE	16.62	-0.0082	-0.61	0.00

TABLE 12.4 – Summary of the results of QTL analyses using the three connected wheat mapping population grown in seven environments for anthesis date (AD), grain protein concentration (GPC), grain protein deviation (GPD) and grain yield (GY). Information displayed for each trait : the chromosomes for which QTL were found, the number of QTL, the number of environments where QTL were found, the minimum and maximum values for individual R^2 (percentage of phenotypic variance explained by individual QTL), full model R^2 (percentage of phenotypic variance explained taking into account all the QTL identified for a given trait in a given environment) and additive effect of the CF9107 parent.

Trait	Individual R^2	« full model » R^2	Additive effect	Chromosomes	Number of QTL
AD	[1.7 ; 68.6]	[44.7 ; 88.4]	[-4.8 ; 7]	1A, 1B, 2A, 2D, 4A, 4B, 5A, 5B, 7B, 7D	56
GPC	[7.7 ; 42.4]	[13.7 ; 58.9]	[-1.56 ; 1.2]	1A, 1D, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 5D, 7B, 7D	45
GPD	[7.5 ; 27.6]	[17.8 ; 46.6]	[-0.93 ; 0.94]	1B, 2A, 2D, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 7B, 7D	36
GY	[7.6 ; 28.9]	[13 ; 51.4]	[-115 ; 69]	1B, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 5A, 5B, 7B, 7D	29

Due to the weak GPC-GY relationship in most environments, GPC and GPD were highly correlated (r ranging from 0.78 to 1, data not shown) leading to almost perfectly co-locating QTL detected for these two traits and very similar additive effects (Figure 12.2 p. 138). Only two QTL showed slightly different effect when assessed for GPC or GPD. The effect of the Quebon allele for the QTL found on chromosome 2D for the TORQUE population in cf.8.Np was -1.6 for GPC and -0.9 for GPD and the effect of the CF9107 allele for the QTL found on the 7D for CFQUE in nw.9.Nl was 1.1 for GPC and 0.71 for GPD.

Thus, if GPD appeared as a potentially interesting trait to improve GPC without reducing GY or maintain GPC along the course of GY improvement (Monaghan et al., 2001; Oury and Godin, 2007), it is not valuable for the present QTL analysis as these mapping populations show weak GPC-GY relationship. A weak GPC-GY correlation has already been reported by Kibite and Evans (1984) that studied seven wheat populations. Higher negative correlations are generally reported when using series of cultivars than using segregating populations.

This could be related to the fact that selection for high GY / low GPC or high GPC / low GY cultivars tended to steepen the slope of the GPC-GY relationship in registered elite bred material. To present further results, only QTL for GPC will be then reported as this appeared sufficient to suggest potential molecular markers to improve GPC independently of GY.

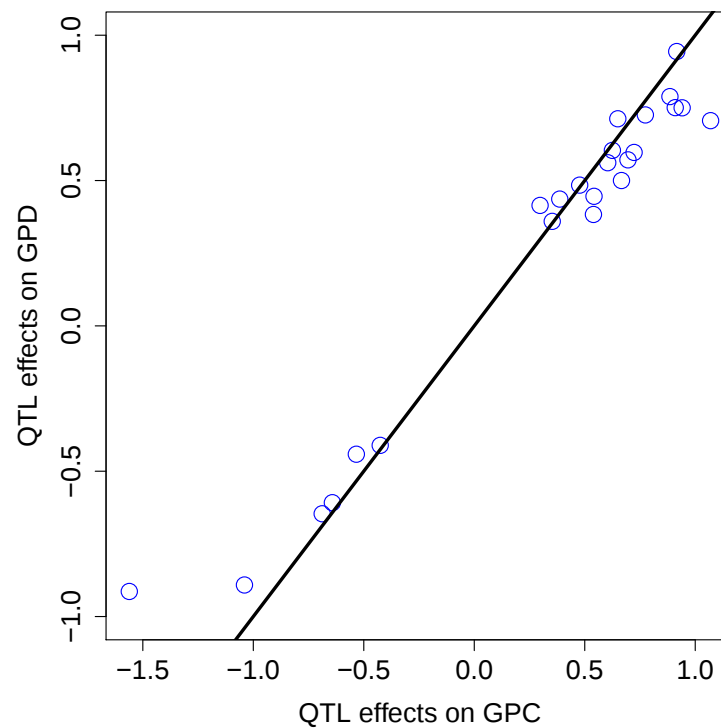


FIGURE 12.2 – Comparison of the effects of the CF9107 (TOR107, CFQUE populations) or Quebon (TORQUE) allele at the QTL found for GPC and GPD on the three mapping populations used in this study. Straight line is 1 :1 line.

Two to eight QTL were found for AD depending on the considered environment. The percentage of phenotypic variance explained taking into account all the QTL detected ranged from 45 to 88% depending on the considered environment (Table 12.4 p. 137). The additive effects of the QTL for AD ranged from -5 days to +7 days. Among the QTL found for AD,

those on the 2D and 7D chromosomes had the largest additive effects with +5.8 days and -3.4 days on average, respectively. These QTL are related to the *PPD-D1* and presumably the vernalization *VRN-D3* gene linked to the “barc126” marker according to [Bonnin et al. \(2008\)](#).

One to five QTL were found for GY depending on the considered environment and the percentage of phenotypic variance explained taking into account all the QTL detected in a given environment ranged from 7.68 to 29% (Table 12.4 p. 137). The additive effects of the QTL for GY ranged from -115g.m⁻² to +69g.m⁻². Among the chromosomes carrying QTL for GY, the 2D, 7B and 7D were highly represented with QTL identified in four, six and eight population × environment combinations, respectively.

One to seven QTL were found for GPC depending on the considered environment and the percentage of phenotypic variance explained taking into account all the QTL detected in a given environment ranged from 14 to 59% (Table 12.4 p. 137). The additive effects of the QTL found for GPC ranged from -1.6 to +1.2 points of GPC.

The 2A chromosome carried 15 QTL found for GPC on the TOR107 and TORQUE populations in six common environments and in three additional environments on one of these populations only. The CF9107 or the Quebon allele increased GPC at this QTL for the TOR107 or TORQUE population, respectively. Chromosome 3B carried QTL found in five environments on the TOR107 population only ; the favourable allele being the Toison d'or allele. The 7D carried QTL for GPC found in three environments on both the TOR107 and CFQUE populations and in four additional environments for the CFQUE population only. This simple description put forward QTL found on chromosome 2A as the most robust in determining GPC.

Linkage groups carrying at least five QTL for GPC, whatever the population or the environment where these QTL were detected, were analysed using the Biomercator software in order to cluster these QTL into meta-QTL. The considered linkage groups were the 2A2, 3B2, and 7D.

Linkage group 2A2 carried 21 QTL among which three were detected for AD on the TOR107 population ; two and one were detected for GY on the TORQUE and TOR107 populations, respectively ; 15 were detected for GPC (eight for the TORQUE and seven for the TOR107 population ; Figure 12.3 p. 140). According to the meta-analysis, the most probable model led to declare two separate clusters, one including the QTL found for AD and one including all the others. This latter cluster comprised predominantly QTL for GPC. Using mean values across all environments and values obtained in nw.9.Nl for the TORQUE population, QTL were found at the same location for both GY and GPC, suggesting that this region contributed to the negative GPC-GY relationship for this population in those environments (Figure 12.6 p. 143).

Anyway, the contribution of this region to the GPC-GY relationship was low as numerous QTL were found for GPC independently of GY and inversely, a QTL found for GY in sb.9.Nl on the TOR107 population was not associated to any QTL for GPC in this environment.



FIGURE 12.3 – Confidence intervals (LOD-1 drop off) of the QTL found on the 2A chromosome. QTL identifiers correspond to the population where QTL was detected (CF9107 $\times$ QUEBON, CFQUE; TOISONDOR $\times$ CF9107, TOR107; TOISONDOR $\times$ QUEBON, TORQUE), the trait for which it was detected (anthesis date, AD; grain protein concentration, GPC, grain protein deviation, GPD; grain yield, GY) and the environment where it was detected (environment abbreviations are given in Table 12.1 p. 129).

Linkage group 3B2 carried seven QTL among which one was found for GY on each of the TORQUE and CFQUE populations and five for GPC on the TOR107 population (Figure 12.4 p. 141). As the QTL found for GY on the CFQUE population was clearly isolated (its confidence interval did not overlap any other QTL), it was discarded for further analysis. Meta-analysis led to declare one QTL clusters including only QTL for GPC found on the TOR107 population except one QTL found for GY on the TORQUE population.

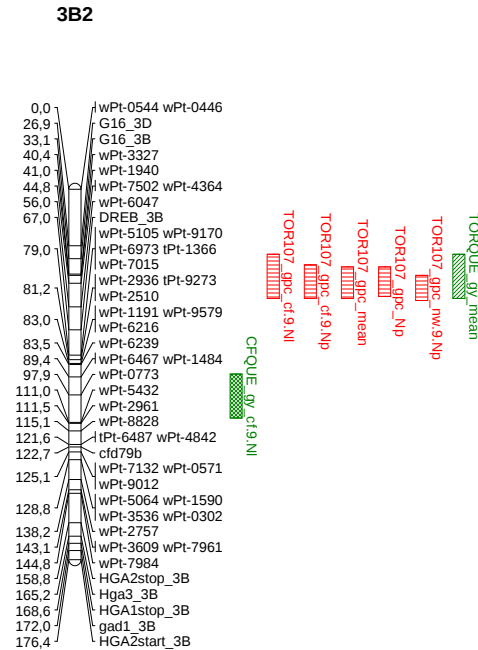


FIGURE 12.4 – Confidence intervals (LOD-1 drop off) of the QTL found on the 3B chromosome. QTL identifiers correspond to the population where QTL was detected (CF9107 $\times$ QUEBON, CFQUE; TOISONDOR $\times$ CF9107, TOR107; TOISONDOR $\times$ QUEBON, TORQUE), the trait for which it was detected (anthesis date, AD; grain protein concentration, GPC, grain protein deviation, GPD; grain yield, GY) and the environment where it was detected (environment abbreviations are given in Table 12.1 p. 129).

Linkage group 7D carried 33 QTL with five and ten were found for AD, seven and three for GPC and three and five for GY on the CFQUE and TOR107 populations, respectively (Figure 12.5 p. 142). Meta-analysis led to declare one unique QTL clusters comprising all these QTL and including the SSR marker “barc126” linked to the *VRN-D3* gene involved in the determinism of flowering time in wheat (Bonnin et al., 2008).

Interestingly, QTL found for GPC were frequently associated to QTL for GY found on the CFQUE and TOR107 population (Figure 12.5 p. 142). Regarding the CFQUE population, QTL for GY and GPC collocating in this region were found in cf.8.Np, nw.9.Nl, and nw.9.Np. Considering the TOR107 population, collocation of QTL for GY and GPC were found in nw.9.Np and using mean values across all the environments studied. This suggests that this region has pleiotropic effects on GY and GPC and thus contributes to the GPC-GY relationship.

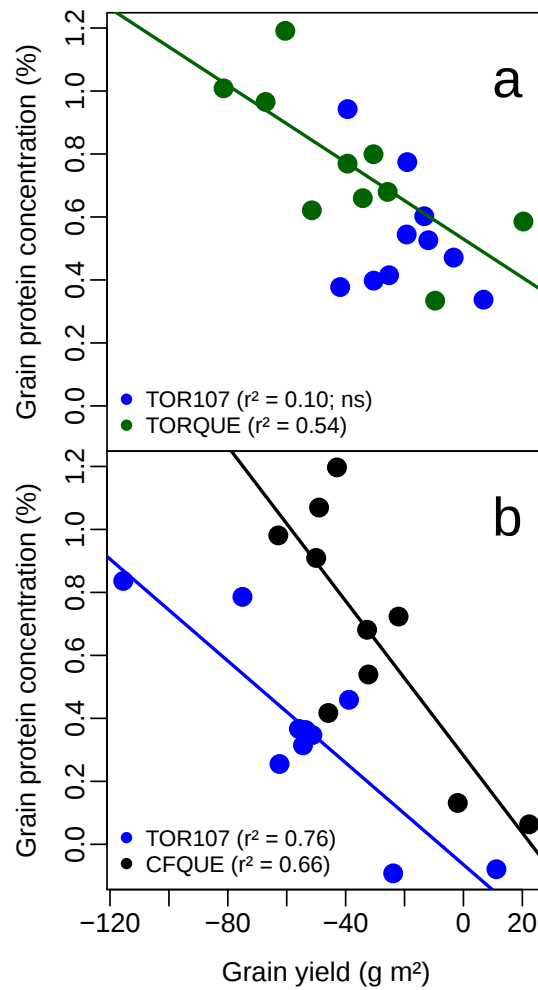


FIGURE 12.6 – Additive effects of the CF9107 (TOR107, CFQUE) or Quebon allele (TORQUE) at the closest marker of the putative pleiotropic QTL for grain protein concentration (GPC) and grain yield (GY) detected on chromosome 2A2 (a) and 7D (b) calculated for each population $\times$ environment combinations. Closest markers are “wPt-9104” and “wPt-4115”, respectively.

12.4.4 Allelic effects of the genomic regions determining GPC independently of GY or contributing to the GPC-GY relationship

On linkage group 2A2, one meta-QTL comprising predominantly QTL for GPC on the TOR107 and TORQUE populations was found. At this region, the CF9107 allele increased GPC from 0.35 to 0.94 point and the Quebon allele increased GPC from 0.62 to 1.00 point depending on the considered environment and compared each time to the Toison d'or allele. The closest marker to the putative position of the meta-QTL was the DArT® “wPt-7285” marker. The high stability of this region increasing GPC makes it a potentially interesting target to improve GPC in wheat.

QTL for wheat grain protein content were already reported on chromosome 2A (Groos et al., 2003; Laperche et al., 2007). A chloroplastic glutamine synthase gene (GS2) has been recently mapped on homeologous group 2 of wheat genome between markers “gwm294” and “wmc181” (Li et al., 2010). Moreover, they reported a significant association with a polymorphism in the gene and different agronomic traits including grain nitrogen content using association genetics on a collection of Chinese wheat varieties.

The lack of common markers between maps hampers concluding this locus is the same but according to the consensus map integrating DArT® and SSR markers from Crossa et al. (2007), one of the markers (“wPt-2087”) in the vicinity of this QTL is closely linked to “gwm294” and “wmc181” (1.3 and 2.7cM away from these markers, respectively) near which GS2 has been mapped.

On linkage group 3B2, one meta-QTL was identified comprising QTL for GPC on the TOR107 found in five environments and one QTL for GY found on the TORQUE populations using mean values across all the studied environments. At this region, the CF9107 allele decreased GPC from -0.43 to -1.00 point depending on the considered environment. No collocation of QTL for GY and GPC were found. The closest marker to the putative position of the meta-QTL was DArT® “wPt-7502”. This stable QTL for GPC was found in only one population although a bi-allelic situation would necessary result in a QTL detected in two populations.

This suggests different hypotheses : either three alleles are present, with an intermediate effect of the Quebon allele that lead to no QTL detected in the two TORQUE and CFQUE populations, or a dependence upon the genetic background with an epistatic interaction to other QTL. This latter possibly will reduce the benefits of using it in breeding.

On linkage group 7D, one meta-QTL presumably including the *VRN-D3* gene comprising QTL for AD, GPC and GY found on the TOR107 and the CFQUE populations was identified. At this region, the CF9107 allele decreased AD (from -3.0 to -4.8 days), increased GPC (from 0.36 to 0.68 point) and decreased GY (from -52 to -115 g.m⁻²) in the TOR107 population. It decreased AD (from -2 to -2.6 days), increased GPC (from 0.54 to 1.20 point) and decreased GY (from -43 to -63 g.m⁻²) in the CFQUE population. The closest marker to the putative position of the meta-QTL was DArT® “wPt-4115”, 18cM away from the “barc126” marker.

Allelic effects of the QTL for GY and GPC collocating on the 2A2 and 7D linkage groups were calculated for each environment and each of the two populations for which it was detected. This highlighted the antagonistic effect of these QTL on GY and GPC suggesting they contributed to the GPC-GY relationship (Figure 12.6 p. 143).

On linkage group 2A2, collocations were found for the TORQUE population in nw.9.NI and using mean values across all the environments studied. However, no such collocation

was found for the TOR107 population suggesting an effect of the genetic background as shown by the non-significant determination coefficient of QTL effects on GY and GPC for the TOR107 population (Figure 12.6 p. 143).

On the 7D chromosome, collocation of QTL for GY and GPC were found in nw.9.Np or using mean values across all the environments studied for the TOR107 population and in cf.8.Np, nw.9.Nl and nw.9.Np for the CFQUE population. The fact that these collocations were found in two populations and five environments suggests that this region contributes more to the GPC-GY relationship than the meta-QTL found on chromosome 2A. This is supported by the strong determination coefficient of QTL effects on GY and GPC for these two populations (Figure 12.6 p. 143).

The pleiotropic effects of these regions on GPC and GY might be related to an effect on leaf senescence duration during the post-anthesis period. Indeed, these regions on the 2A and 7D chromosomes have been shown to affect leaf senescence duration on the TOR107 population (Bogard et al, submitted). Leaf senescence duration during the grain filling period is a possible candidate trait to explain the GPC-GY. In wheat, grain nitrogen mostly comes from N taken up during the vegetative period and remobilised to the grain after anthesis (Sanford and MacKown, 1986; Barbottin et al., 2005; Kichey et al., 2007), while C assimilated after flowering is the main source of C for starch synthesis in the grain (Triboï et al., 2006).

Therefore, the duration of leaf activity during the post-anthesis period largely affects the capabilities for C assimilation but also the N remobilisation efficiency. Later leaf senescence promotes C assimilation and generally results in low N remobilisation efficiency, the inverse being generally true for early senescent genotypes (Gregersen et al., 2008). It is therefore reasonable to hypothesize that the effects of the regions identified in the present study affect the GPC-GY relationship through an effect on post-anthesis leaf senescence duration.

12.5 Conclusion

In order to identify genomic regions consistent across populations and environments potentially useful to improve GPC independently of GY in wheat, QTL analysis was carried out for AD, GPC, GY and the deviation to the GPC-GY relationship called GPD on three connected mapping populations grown in a large multi-environment trial. Meta-analysis of QTL was carried out for chromosomes containing QTL for GPC identified across different populations or environments. This highlighted three regions on chromosomes 2A, 3B and 7D, the latter being associated to a stable QTL for AD, presumably related to the *VRN-D3* gene. As the region on the 3B determining GPC was detected only in one population, benefits of using this region in breeding might be reduced. Regarding regions on the 2A and 7D chromosomes, QTL for GPC were found on two populations and were frequently associated to QTL for GY, showing these regions contribute to the GPC-GY relationship. However, the 2A region appeared more interesting to improve GPC as it was independent of AD, stable across environments and contributed less to the GPC-GY relationship.

Supplementary data

Results of QTL detection are publicly available at <http://urgi.versailles.inra.fr/GnpMap/mapping/welcome.do>

Funding This work was supported by the “NUE traits” project [IN-BB-06] (<http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/bab/mas-projects/NUE.html>); funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the British Biotechnology Science and Research Coun-

cil (BBSRC).

12.5.1 Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the experimental work carried out by Olivier Gardet and Stéphane Gilles (INRA, Le Moulon), Joëlle Messaoud, Séverine Rougeol, Jean-Louis Joseph and Pascal Lemaire (INRA, Clermont-Ferrand), Brasseur Dominique (INRA, Estrées-Mons), Rob Perdue (University of Nottingham, Sutton Bonington), and Simon Orford (John Innes Center, Norwich).

Septième partie

Synthèse des résultats et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de contribuer de manière significative à la compréhension des bases génétiques et écophysiologiques de l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains ("Grain Protein Deviation", GPD) chez le blé tendre d'hiver. Après un rappel des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse, des perspectives de recherche envisageables sont présentées pour chacun d'eux.

Chapitre 13

L'absorption d'azote post-floraison est un déterminant majeur du GPD

Nous avons pu montrer que la variabilité génétique pour le GPD est reliée, dans les conditions agro-climatiques du Nord-Ouest de l'Europe, à la variabilité génétique pour l'absorption d'azote post-floraison indépendamment de la quantité d'azote absorbée à floraison. Ceci n'exclue pas que, dans des contextes agro-climatiques différents, la quantité d'azote remobilisée ou l'efficacité de remobilisation puissent être des composantes importantes du GPD. Ainsi, la teneur en protéines chez le blé dur, une espèce cultivée en zone méditerranéenne, semble plutôt déterminée par la quantité d'azote remobilisée (Joppa et al., 1997). Afin d'améliorer la teneur en protéines sans diminuer le rendement en grains des blés cultivés en Argentine, Slafer et al. (1990) suggèrent de cibler en amélioration variétale la quantité d'azote absorbée avant floraison tout en maintenant une forte efficacité de remobilisation de cet élément.

Au cours de cette première étude, nous sommes passés de l'étude des résidus de la régression teneur en protéines - rendement en grains à celle des résidus de la relation quantité d'azote absorbée post-floraison - quantité d'azote absorbée à floraison. Ce changement de cadre conceptuel nous a permis de proposer des caractères physiologiques susceptibles d'expliquer la variabilité génétique pour le GPD à travers un effet sur l'absorption d'azote post-floraison (Figure 9.2, p.67).

D'autre part, nous avons pu montrer, au cours de la seconde étude qui portait sur les relations entre durée de sénescence des feuilles après floraison, teneur en protéines et rendement en grains, qu'un allongement de la durée de sénescence est associée, dans certains environnements, à une augmentation de la teneur en protéines sans pénaliser le rendement en grains. Ceci est en contradiction avec l'étude d'Uauy et al. (2006) qui montre, sur une population de blé dur, qu'une sénescence accélérée est associée à une augmentation de la teneur en protéines. L'architecture génétique du blé dur ainsi que son adaptation à des zones climatiques plus stressantes au cours du remplissage du grain peuvent laisser penser que des mécanismes physiologiques différents sont susceptibles d'être prépondérants chez cette espèce. La création et l'évaluation en cours de matériel isogénique pour *NAM-B1* dans différents fonds génétiques adaptés aux conditions agro-climatiques de l'Europe du Nord-Ouest permettra de vérifier si ce gène augmente effectivement la teneur en protéines sans diminuer le rendement en grains dans un contexte agro-climatique plus favorable à l'absorption d'azote post-floraison.

Nous avons fait l'hypothèse qu'il existe un mécanisme similaire à celui proposé par Borrell et al. (2001), lesquels montrent que le maintien d'une canopée verte et active durant la

période post-floraison permet de maintenir l'activité racinaire et l'absorption d'azote durant cette période. Nous ajoutons à cela une possible modulation de ce mécanisme écophysiologique (qui reste hypothétique) conduisant à modifier la pente de la relation teneur en protéines - rendement en grains en fonction de la disponibilité en azote.

Ces résultats mettent en exergue deux grands types de processus dont une compréhension plus fine serait nécessaire à une validation des hypothèses formulées. D'une part les mécanismes impliqués dans la régulation de l'absorption d'azote par le statut azoté *via* des signaux de satiété nécessitent des études approfondies. D'autre part, les processus liés au fonctionnement et à l'architecture racinaire qui peuvent potentiellement exercer un rôle prépondérant dans les mécanismes mis à jour. Jusqu'à présent, ceux-ci ont été relativement peu étudiés en particulier du fait de la difficulté d'accéder au compartiment racinaire en conditions agronomiques.

13.1 Perspectives d'étude des mécanismes de régulation de l'absorption d'azote post-floraison par le statut azoté

L'existence d'une régulation de l'absorption d'azote par le statut azoté chez le blé a été démontrée (Barneix, 2007). En particulier, la concentration en acides aminés de la sève élaborée régule l'expression de transporteurs de nitrates (Glass et al., 2002; Glass, 2009). Nous faisons donc l'hypothèse qu'une variabilité génétique pour la réponse des gènes régulés par des signaux internes reflétant le statut azoté pourrait expliquer les différences d'absorption d'azote post-floraison indépendamment du statut azoté à floraison.

Il est admis que l'absorption d'azote chez les plantes dépend majoritairement de la demande (Gastal and Lemaire, 2002). Or, il a été démontré qu'après un épisode transitoire de carence azotée, une variabilité génétique existe pour l'absorption d'azote indépendamment de la production de biomasse chez *A. thaliana* et *Lotus japonicus*, laquelle est reliée à une expression différentielle de transporteurs de nitrates (Gansel et al., 2001; Harrison et al., 2004; Richard-Molard et al., 2008). Ceci conduit à reconsidérer la relation entre croissance (demande en carbone et en azote) et absorption d'azote et suggère l'existence d'une variabilité génétique pour l'absorption d'azote indépendamment du statut azoté.

Afin de tester cette hypothèse, un plan expérimental adapté comprenant différents traitements azotés avant floraison et une mesure précise de la cinétique d'absorption d'azote post-floraison pour des lignées différant pour le GPD serait envisageable. Il serait alors nécessaire de caractériser le statut azoté à floraison, ce qui est possible à l'échelle de la plante entière en utilisant l'indice de nutrition azoté (INN; (Justes et al., 1994), et de mettre en regard cet INN avec les paramètres de cinétique d'absorption d'azote post-floraison. Ces mesures pourraient être complétées au niveau moléculaire par des mesures de l'expression de transporteurs de nitrates et des gènes majeurs de l'assimilation primaire de l'azote. D'autre part, le statut azoté pourrait être plus finement caractérisé en dosant de façon spécifique les principaux métabolites carbonés et azotés ainsi que le permettent les techniques de métabolomique ciblée (Tschoep et al., 2009).

13.2 Perspectives d'étude de la variabilité génétique pour l'architecture et le fonctionnement racinaire

Le deuxième type de processus évoqué touche moins à un éventuel contrôle de la satiété qu'à la capacité d'exploration du système racinaire. Pour l'étude de l'architecture racinaire (longueur des racines, ramification...) il existe des systèmes (culture hydroponique, rhizotron) déjà utilisés sur blé (Laperche et al., 2006; Manschadi et al., 2008) qui permettent d'avoir accès de manière non destructive au compartiment racinaire. Ces systèmes de culture conduisent à une croissance "exagérée" du système racinaire, celui-ci ne subissant pas de contraintes mécaniques au cours de sa croissance. Une solution pour simuler la résistance mécanique d'un sol en conditions contrôlées consisterait à utiliser un support de billes de verre couplé à un système d'analyse d'image (projet de plateforme "Rhizophen" au CIRAD de Montpellier).

Néanmoins, il a été montré que les résultats obtenus en conditions hydroponiques peuvent être raisonnablement extrapolés aux conditions rencontrées "au champ" (Loresto et al. 1983 cité par Price et al. (1997)). De plus, il a été montré qu'il est possible d'inférer des caractéristiques de l'architecture racinaire de plantes en peuplement à floraison à partir de mesures réalisées sur plantules (Manschadi et al., 2008). Il devient alors envisageable de réaliser un phénotypage à haut-débit compatible avec des approches de génétique quantitative nécessitant de réaliser des mesures sur un effectif important.

Une telle approche nécessite dans un premier temps de valider sans ambiguïté le lien fonctionnel entre la variabilité génétique pour des caractères liés à l'architecture du système racinaire et la variabilité génétique associée à l'acquisition d'azote par la plante. En effet, la méthode de mesure de l'absorption d'azote post-floraison utilisée dans notre étude souffre de nombreux biais, ce qui est attesté par les forts coefficients de variation observés pour cette variable et qui a par ailleurs été souligné dans d'autres études (Mi et al., 2000; Kichey et al., 2007). Ces limitations techniques pourraient être circonvenues par l'utilisation de méthodes de quantification plus précises comme l'application d'un isotope lourd de l'azote (^{15}N) pouvant être tracé par spectrométrie de masse. Néanmoins, cette méthode est coûteuse et difficile à mettre en pratique "au champ" sur un nombre élevé de génotypes et d'environnements d'étude bien qu'elle ait été utilisée avec succès chez le maïs (Coque and Gallais, 2006; Coque et al., 2008).

Plus généralement, dans la perspective d'étudier l'impact de caractères physiologiques liés au système racinaire et d'identifier les régions chromosomiques associées, un système de phénotypage haut-débit proche des conditions agronomiques apparaît nécessaire. Des capteurs permettant de mesurer finement la concentration en nitrates (électrodes "ions spécifiques") au niveau d'un tissu ont été développés (Miller and Zhen, 1991) et utilisés sur blé en conditions contrôlées (Fan et al., 2007). Les développements en cours de cette technique pourraient permettre de l'utiliser en conditions agronomiques. Il serait alors envisageable de coupler ces capteurs avec des dispositifs optiques (mini-rhizotron) sous chaque parcelle afin de mesurer conjointement et de manière dynamique la disponibilité en azote, la densité racinaire et des paramètres architecturaux. D'emblée, le coût d'un tel système pourrait être un des facteurs limitant sa mise en place mais celui-ci pourrait être envisagé comme une plateforme utilisable par des équipes de recherche travaillant sur d'autres thématiques ou d'autres espèces.

Chapitre 14

Certaines régions chromosomiques sont susceptibles d'augmenter la teneur en protéines sans diminuer le rendement en grains

Nous avons pu mettre en évidence des régions chromosomiques susceptibles de contribuer à augmenter la teneur en protéines sans diminuer le rendement en grains sur les chromosomes 2A et 3B dans certains environnements et fonds génétiques. Ces régions pourraient être validées, soit par génétique d'association (projet “ProtNblé” en cours d'analyse), soit en construisant des lignées quasi-isogéniques par rétrocroisement, ce qui ouvrirait la voie à de la cartographie fine des QTL les plus intéressants afin d'identifier les gènes sous-jacents. A l'heure actuelle, ce type d'étude reste laborieuse (et coûteuse) du fait que le séquençage du génome du blé n'a pas encore été réalisé. Par ailleurs, les positions de ces QTL pourraient être affinées en densifiant la carte génétique.

Dans la même perspective, le typage de marqueurs permettant de comparer les QTL identifiés dans d'autres études pourrait amener de la valeur ajoutée à ce travail. En effet, les cartes génétiques utilisées dans nos études ont été bâties majoritairement à l'aide de marqueurs DArT® dont l'utilisation est récente. Différentes cartes génétiques consensus existent chez le blé (Somers et al., 2004; Quarrie et al., 2005; Xue et al., 2008) mais, à ce jour, seule une carte intègre des DArT® (Crossa et al., 2007) et celle-ci ne reflète pas l'intégralité du génome du blé (absence du chromosome 6D). La création d'une telle carte pourrait permettre de faciliter les comparaisons. Une autre solution serait de passer un jeu de marqueurs communs sur l'ensemble des populations disponibles à l'INRA, ce qui est prévu dans le projet “DArT-Blé” impliquant les centres INRA de Montpellier et Clermont-Ferrand, au cours duquel 1200 lignées INRA seront typées.

Enfin, la contribution de ces études de détection de QTL à la compréhension des déterminants physiologiques du GPD pourrait être accrue par une dissection fine des interactions QTL $\times$ environnement. L'inclusion de covariables environnementales pertinentes dans les modèles de détection de QTL pourrait permettre d'atteindre ce but (van Eeuwijk et al., 2010).

Chapitre 15

Vers une intégration des études génétiques et physiologiques

Au vu de cette synthèse des résultats obtenus sur les déterminants génétiques et écophysiologiques du GPD, il apparaît que, d'une part, le contexte agro-climatique est susceptible de modifier le poids des déterminants du GPD et que, d'autre part, ces interactions génotype $\times$ environnement, en dépit de leur importance, sont mal prises en compte, notamment dans la recherche de QTL. D'autres études combinant à la fois génétique, écophysiologie et modélisation pourraient permettre d'adresser cette problématique.

Une approche envisageable consiste à réaliser un travail de caractérisation et de typologie des environnements étudiés (approche "diagnostic agronomique") permettant d'identifier et de quantifier les facteurs limitants apparus dans chacun des environnements (Brancourt-Hulmel et al., 1999, 2000; Lacaze and Roumet, 2004). Un tel travail permet d'une part de mettre à jour la nature biologique des interactions QTL $\times$ environnement et d'autre part d'identifier les QTL les plus intéressants pour chaque type d'environnement. Une telle approche reste néanmoins semi-quantitative dans la mesure où les facteurs limitants ne sont pas contrôlés et leurs intensités déterminées de manière relative à leur importance dans le réseau d'expérimentation étudié.

Des approches plus globales intégrant les informations provenant d'analyses de génétique quantitative dans des modèles écophysiologiques peuvent être envisagées. Les études de génétique quantitative permettent de prédire les performances de différents génotypes connaissant leur composition allélique à différents *loci*, mais seulement dans des conditions environnementales similaires à celles ayant permis d'identifier ces *loci* comme ayant un impact significatif sur les performances génotypiques. À l'inverse, les modèles écophysiologiques permettent de prédire les performances d'un génotype dans différentes conditions environnementales en utilisant des paramètres indépendants de l'environnement. Dès lors, l'utilisation dans les modèles écophysiologiques de paramètres "génotype-dépendant" pourrait permettre de prédire le comportement de différents génotypes dans différentes conditions environnementales.

Dans ce type d'approche, le choix des paramètres à étudier est primordial. Il peut être réalisé *a priori* en établissant des courbes de réponse entre une variable de l'environnement dont on sait qu'elle a potentiellement un impact important et le caractère ciblé comme cela a été réalisé sur la vitesse d'élongation foliaire chez le maïs dans le cas d'un stress hydrique (Salah and Tardieu, 1997; Tardieu et al., 2000). Une telle approche nécessite en amont l'identification de processus clés, à une échelle suffisamment fine pour que l'effet des variables environnementales puisse être décrit avec un formalisme du type "courbe de réponse". Typiquement, appliquer une telle approche sur des caractères aussi intégratifs que

le rendement en grains ou la teneur en protéines nécessite un important travail préliminaire d'identification des variables environnementales limitantes et de décomposition du caractère complexe en mécanismes ayant un déterminisme plus simple.

Une autre méthode de sélection des paramètres consiste à réaliser une analyse de sensibilité sur les paramètres de modèles écophysiologiques *a priori* indépendant de l'environnement (Quilot et al., 2005). Ceci permet d'identifier les paramètres qui ont le poids le plus important dans le modèle pour la prédiction d'un caractère donné. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'avoir d'*a priori* sur les variables environnementales qui affectent le caractère ciblé. En revanche, la difficulté est de pouvoir trouver des paramètres mesurables précisément sur un large panel de génotypes et dans différentes conditions environnementales.

Une fois les paramètres clés définis, la méthodologie consiste à mesurer ou à optimiser ces paramètres sur une population de cartographie et à réaliser une détection de QTL pour ces valeurs de paramètres. Ces informations génétiques sont finalement intégrées au modèle écophysiologique en remplaçant les paramètres par la valeur des effets des QTL. Le modèle est ensuite validé en comparant les valeurs prédites par le modèle et celles observées pour différents génotypes expérimentés dans différentes conditions (Reymond et al., 2003, 2004; Quilot et al., 2005).

Cette approche pourrait être réalisée chez le blé à l'aide de modèles tels que "Sirius Quality" (Jamieson et al., 1998) ou "APSIM wheat" (Keating et al., 2003), afin de mettre en évidence des paramètres indépendants de l'environnement ayant le poids le plus important dans le déterminisme du GPD. Cela ouvrirait ainsi la voie à une approche de type "QTL-based modeling" pour le GPD, comme cela a déjà été réalisé pour la date de floraison chez l'orge (Yin et al., 2005). La force de ces approches réside dans le fait qu'elles permettent de bâtir des idéotypes (combinaisons alléliques) intégrant les contraintes liées à des environnements spécifiques. En effet, il devient possible, à partir de données pédoclimatiques et de la connaissance des paramètres génotypiques déterminant un caractère cible, de rechercher quelles sont les meilleures combinaisons alléliques pour un environnement donné. Ainsi, ce type d'approche offre des perspectives intéressantes pour l'amélioration de caractères complexes tels que le rendement en grains ou la teneur en protéines du blé car elles permettent de prendre en compte le système dans sa globalité, incluant notamment les interactions génotypes $\times$ environnement. Au final, ces approches interdisciplinaires pourraient permettre de cibler les allèles les plus favorables à combiner, *via* la sélection assistée par marqueurs, en fonction de la population d'environnements ciblée par un programme de sélection (Hammer et al., 2006).

Huitième partie

addendum

Relation entre le GPD et le coefficient de corrélation de la régression linéaire teneur en protéines - rendement en grains

1. $GPC = a + b \times GY + GPD$ d'où
 2. $GPD = GPC - a - b \times GY$ avec
GY : rendement en grains
GPC : teneur en protéines
GPD : résidus de la régression
a : intercepte de la régression
b : pente de la régression
 3. $b = \frac{cov(GY, GPC)}{var(GY)}$ d'où
 4. $cov(GY, GPC) = b \times var(GY)$ avec
cov : covariance
var : variance
 5. $R^2 = \frac{cov(GY, GPC)^2}{var(GY) \times var(GPC)}$ avec
 R^2 : coefficient de détermination entre la teneur en protéines et le rendement en grains
 6. $R^2 = \frac{b^2 \times var(GY)}{var(GPC)}$
 7. $var(GPC) = \frac{b^2 \times var(GY)}{R^2}$
 8. $var(GPD) = var(GPC - b \times GY)$
 $var(GPD) = var(GPC) + b^2 \times var(GY) - 2 \times b \times cov(GY, GPC)$
 $var(GPD) = var(GPC) + b^2 \times var(GY) - 2 \times b^2 \times var(GY)$
 $var(GPD) = var(GPC) - b^2 \times var(GY)$
 9. $var(GPC) = var(GPD) + b^2 \times var(GY)$
 10. $R^2 = \frac{b^2 \times var(GY)}{var(GPD) + b^2 \times var(GY)}$
 11. $var(GPD) = \frac{(1 - R^2) \times b^2 \times var(GY)}{R^2}$
 12. $R = \frac{cov(GY, GPC)}{\sqrt{var(GY) \times var(GPC)}}$ avec
R : coefficient de corrélation entre la teneur en protéines et le GPD
 13. $R = \frac{cov(GPC - b \times GY, GPC)}{\sqrt{var(GPC - b \times GY) \times var(GPC)}}$
 14. $R = \frac{var(GPC) - b \times cov(GY, GPC)}{\sqrt{var(GPC) + b^2 \times var(GY) - 2 \times b \times cov(GY, GPC) \times var(GPC)}}$
- D'après (4) et (9) :
- $$R = \frac{b^2 \times var(GY) / R^2 - b^2 \times var(GY)}{\sqrt{(var(GPC)^2 + b^2 \times var(GY) \times var(GPC) - 2 \times b \times cov(GY, GPC)) \times var(GPC)}}$$

$$R = \frac{b^2 \times \text{var}(GY) \times (1-R^2)/R^2}{\sqrt{(b^2 \times \text{var}(GY)/R^2)^2 + b^2 \times \text{var}(GY) \times b^2 \times \text{var}(GY)/R^2 - 2 \times b^2 \times \text{var}(GY) - 2 \times b^2 \times \text{var}(GY) \times b^2 \times \text{var}(GY)/R^2}}$$

$$R = \frac{b^2 \times \text{var}(GY) \times (1-R^2)/R^2}{\sqrt{(b^4 \times \text{var}(GY)^2/R^4 + b^4 \times \text{var}(GY)^2/R^2 - 2 \times b^4 \times \text{var}(GY)^2/R^2)}}$$

$$R = \frac{b^2 \times \text{var}(GY) \times (1-R^2)/R^2}{\sqrt{(b^4 \times \text{var}(GY)^2/R^4 - b^4 \times \text{var}(GY)^2/R^2)}}$$

$$R = \frac{b^2 \times \text{var}(GY) \times (1-R^2)/R^2}{\sqrt{(b^4 \times \text{var}(GY)^2 \times (1-R^2)/R^4)}}$$

$$R = \frac{b^2 \times \text{var}(GY) \times (1-R^2)/R^2}{\sqrt{(b^4 \times \text{var}(GY)^2 \times (1-R^2))}}$$

$$R = \frac{(1-R^2)}{\sqrt{(1-R^2)}}$$

$$15. R = \sqrt{(1-R^2)}$$

Ce qui implique que plus la corrélation entre la teneur en protéines et le rendement en grains est faible et plus la corrélation entre la teneur en protéines et le GPD est forte.

Neuvième partie

Contributions scientifiques

Chapitre 16

Publications réalisées au cours de cette thèse

Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Machet J, Jeuffroy M, Gate P, Martre P, Le Gouis J 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4303-4312.

Chapitre 17

Autres publications

Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology* **9**, 28.

Pierre J, Bogard M, Herrmann D, Huyghe C, Julier B 2010. A *CONSTANS*-like gene candidate that could explain most of the genetic variation for flowering date in *Medicago truncatula*. *Molecular Breeding*. Published online.

Chapitre 18

Contributions lors de conférences internationales

18.1 Communications sous forme de poster

Bogard M, Moreau D, Allard V, Martre P, Le Gouis J Genetic analysis of grain protein deviation in wheat. *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*, 24th - 29th August 2008, Brisbane, QLD, Australia.

Bogard M, Moreau D, Martre P, Heumez E, Orford S, Griffiths S, Gaju O, Foulkes J, Snape J, Allard V, Le Gouis J. Genetic analysis of the kinetics of monocarpic leaf senescence in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proceedings of the 19th International Triticeae Mapping Initiative - 3rd COST Tritigen joint meeting*, August 31st - September 4th 2009, Clermont-Ferrand, France.

18.2 Communications sous forme de présentations orales

Bogard M, Moreau D, Jourdan M, Martre P, Heumez E, Orford S, Griffiths S, Gaju O, Foulkes J, Snape J, Allard V, Le Gouis J Genetic analysis of the kinetics of monocarpic senescence in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation with grain protein deviation. *Mini-symposium on domestication of cereals and exploitation of genetic diversity in improvement*, 21st-24th September 2009, Rank Prize Foundation, Windermere, United-Kingdom.

Bogard M, Moreau D, Jourdan M, Martre P, Heumez E, Orford S, Griffiths S, Gaju O, Semenov M, Foulkes J, Snape J, Allard V, Le Gouis J Deciphering the biological basis of grain protein deviation in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *MONOGRAM meeting*, 2nd - 3rd March 2010, Norwich, United-Kingdom.

Bibliographie

- Acreche, M. and Slafer, G. (2009). Variation of grain nitrogen content in relation with grain yield in old and modern Spanish wheats grown under a wide range of agronomic conditions in a Mediterranean region. *The Journal of Agricultural Science*, 147(06) :657–667.
- Aguirrezábal, L., Martre, P., Pereyra Irujo, G., Izquierdo, N., and Allard, V. (2009). *Management and breeding strategies for the improvement of grain and oil quality*. Academic Press.[Estados Unidos]. US.
- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., et al. (2006). Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 113(8) :1409–1420.
- Akhunov, E., Nicolet, C., and Dvorak, J. (2009). Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 119(3) :507–517.
- Altenbach, S., DuPont, F., Kothari, K., Chan, R., Johnson, E., and Lieu, D. (2003). Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain development in a US spring wheat. *Journal of Cereal Science*, 37(1) :9–20.
- Andrews, M., Lea, P., Raven, J., and Lindsey, K. (2004). Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. *Annals of Applied Biology*, 145(1) :25–40.
- Appleford, N. and Lenton, J. (1991). Gibberellins and leaf expansion in near-isogenic wheat lines containing Rht1 and Rht3 dwarfing alleles. *Planta*, 183(2) :229–236.
- Arcade, A., Labourdette, A., Falque, M., Mangin, B., Chardon, F., Charcosset, A., and Joets, J. (2004). BioMercator : integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics*, 20(14) :2324.
- Asplund, L., Hagenblad, J., and Leino, M. (2010). Re-evaluating the history of the wheat domestication gene NAM-B1 using historical plant material. *Journal of Archaeological Science*, 37 :2303–2307.
- Balfourier, F., Roussel, V., Strelchenko, P., Exbrayat-Vinson, F., Sourdille, P., Boutet, G., Koenig, J., Ravel, C., Mitrofanova, O., Beckert, M., et al. (2007). A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114(7) :1265–1275.

- Bannayan, M., Kobayashi, K., Marashi, H., and Hoogenboom, G. (2007). Gene-based modelling for rice : An opportunity to enhance the simulation of rice growth and development ? *Journal of theoretical biology*, 249(3) :593–605.
- Bänziger, M., Feil, B., and Stamp, P. (1994). Competition between nitrogen accumulation and grain growth for carbohydrates during grain filling of wheat. *Crop science*, 34(2) :440–446.
- Barbottin, A., Lecomte, C., Bouchard, C., and Jeuffroy, M. (2005). Nitrogen Remobilization during Grain Filling in Wheat. *Crop science*, 45(3) :1141–1150.
- Barneix, A. (2007). Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of plant physiology*, 164(5) :581–590.
- Bäurle, I. and Dean, C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125(4) :655–664.
- Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J., and Laurie, D. (2007). A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 115(5) :721–733.
- Beman, J., Arrigo, K., and Matson, P. (2005). Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature*, 434(7030) :211–214.
- Bernard, S. and Habash, D. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, 182(3) :608–620.
- Bernard, S., Møller, A., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T., Dubois, F., Baudo, M., Lopes, M., Tercé-Laforgue, T., Foyer, C., et al. (2008). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant molecular biology*, 67(1) :89–105.
- Bertin, P. and Gallais, A. (2000). Physiological and genetic basis of nitrogen use efficiency in maize. II. QTL detection and coincidences. *Maydica*, 45 :67–80.
- Bhatia, C. and Rabson, R. (1976). Bioenergetic considerations in cereal breeding for protein improvement. *Science*, 194(4272) :1418.
- Billotte, N., Jourjon, M., Marseillac, N., Berger, A., Flori, A., Asmady, H., Adon, B., Singh, R., Nouy, B., Potier, F., et al. (2010). QTL detection by multi-parent linkage mapping in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 120(8) :1673–1687.
- Blanc, G., Charcosset, A., Mangin, B., Gallais, A., and Moreau, L. (2006). Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis : an application in maize. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 113(2) :206–224.
- Blanco, A., Pasqualone, A., Troccoli, A., Di Fonzo, N., and Simeone, R. (2002). Detection of grain protein content QTLs across environments in tetraploid wheats. *Plant molecular biology*, 48(5) :615–623.
- Blanco, A., Simeone, R., and Gadaleta, A. (2006). Detection of QTLs for grain protein content in durum wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 112(7) :1195–1204.

- Blumenthal, C., Barlow, E., and Wrigley, C. (1993). Growth environment and wheat quality : the effect of heat stress on dough properties and gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 18(1) :3–21.
- Bogard, M., Allard, V., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Machet, J., Jeuffroy, M., Gate, P., Martre, P., and Le Gouis, J. (2010). Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61 :4303–4312.
- Bolot, S., Abrouk, M., Masood-Quraishi, U., Stein, N., Messing, J., Feuillet, C., and Salse, J. (2009). The 'inner circle' of the cereal genomes. *Current opinion in plant biology*, 12(2) :119–125.
- Bonnin, I., Rousset, M., Madur, D., Sourdille, P., Dupuits, C., Brunel, D., and Goldringer, I. (2008). FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 116(3) :383–394.
- Borrás, L., Slafer, G., and Otegui, M. (2004). Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean : a quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, 86(2-3) :131–146.
- Borrell, A. and Hammer, G. (2000). Nitrogen dynamics and the physiological basis of stay-green in sorghum. *Crop science*, 40(5) :1295–1307.
- Borrell, A., Hammer, G., and Oosterom, E. (2001). Stay-green : A consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology*, 138(1) :91–95.
- Brancourt-Hulmel, M., Denis, J., and Lecomte, C. (2000). Determining environmental covariates which explain genotype $\times$ environment interaction in winter wheat through probe genotypes and biadditive factorial regression. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 100(2) :285–298.
- Brancourt-Hulmel, M., Lecomte, C., and Meynard, J. (1999). A diagnosis of yield-limiting factors on probe genotypes for characterizing environments in winter wheat trials. *Crop science*, 39(6) :1798–1808.
- Branlard, G., Dardevet, M., Saccomano, R., Lagoutte, F., and Gourdon, J. (2001). Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica*, 119(1) :59–67.
- Brisson, N., Gate, P., Gouache, D., Charmet, G., Oury, F., and Huard, F. (2010). Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research*, 119 :201–212.
- Broman, K., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. (2003). R/qtl : QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7) :889.
- Brun, F., Richard-Molard, C., Pages, L., Chelle, M., and Ney, B. (2010). To what extent may changes in the root system architecture of *Arabidopsis thaliana* grown under contrasted homogenous nitrogen regimes be explained by changes in carbon supply? A modelling approach. *Journal of Experimental Botany*, 61 :2157–2169.

- Calderini, D. and Slafer, G. (1998). Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. *Field Crops Research*, 57(3) :335–347.
- Calderini, D., Torres-Leon, S., and Slafer, G. (1995). Consequences of wheat breeding on nitrogen and phosphorus yield, grain nitrogen and phosphorus concentration and associated traits. *Annals of Botany*, 76(3) :315.
- Chardon, F., Virlon, B., Moreau, L., Falque, M., Joets, J., Decousset, L., Murigneux, A., and Charcosset, A. (2004). Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics*, 168(4) :2169.
- Charmet, G., Robert, N., Branlard, G., Linossier, L., Martre, P., and Triboï, E. (2005). Genetic analysis of dry matter and nitrogen accumulation and protein composition in wheat kernels. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 111(3) :540–550.
- Chee, P., Elias, E., Anderson, J., and Kianian, S. (2001). Evaluation of a high grain protein QTL from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* in an adapted durum wheat background. *Crop science*, 41(2) :295–301.
- Chenu, K., Chapman, S., Tardieu, F., McLean, G., Welcker, C., and Hammer, G. (2009). Simulating the yield impacts of organ-level quantitative trait loci associated with drought response in maize : A "gene-to-phenotype" modeling approach. *Genetics*, 183(4) :1507.
- Christopher, J., Manschadi, A., Hammer, G., and Borrell, A. (2008). Stay-green wheat for Australia's changing, dry environment. In *11th International Wheat Genetics Symposium 2008 Proceedings*, page 119. Sydney University Press.
- Colasanti, J. and Coneva, V. (2009). Mechanisms of floral induction in grasses : something borrowed, something new. *Plant Physiology*, 149(1) :56.
- Cooper, M., Woodruff, D., Phillips, I., Basford, K., and Gilmour, A. (2001). Genotype-by-management interactions for grain yield and grain protein concentration of wheat. *Field Crops Research*, 69(1) :47–67.
- Coque, M. and Gallais, A. (2006). Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 112(7) :1205–1220.
- Coque, M., Martin, A., Veyrieras, J., Hirel, B., and Gallais, A. (2008). Genetic variation for N-remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. 3. QTL detection and coincidences. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 117(5) :729–747.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., et al. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316(5827) :1030.
- Cox, M., Qualset, C., and Rains, D. (1986). Genetic variation for nitrogen assimilation and translocation in wheat. III. Nitrogen translocation in relation to grain yield and protein. *Crop science (USA)*, 26 :737–740.

- Crook, M. and Ennos, A. (1995). The effect of nitrogen and growth regulators on stem and root characteristics associated with lodging in two cultivars of winter wheat. *Journal of Experimental Botany*, 46(8) :931.
- Crossa, J., Burgueno, J., Dreisigacker, S., Vargas, M., Herrera-Foessel, S., Lillemo, M., Singh, R., Trethowan, R., Warburton, M., Franco, J., et al. (2007). Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics*.
- Cuthbert, J., Somers, D., Brûlé-Babel, A., Brown, P., and Crow, G. (2008). Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 117(4) :595–608.
- Dalling, M., Boland, G., and Wilson, J. (1976). Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat. *Functional Plant Biology*, 3(6) :721–730.
- De Givry, S., Bouchez, M., Chabrier, P., Milan, D., and Schiex, T. (2005). Carht a Gene : multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics*, 21(8) :1703.
- Del Moral, M. and Del Moral, L. (1995). Tiller production and survival in relation to grain yield in winter and spring barley. *Field Crops Research*, 44(2-3) :85–93.
- Demotes-Mainard, S., Jeuffroy, M., and Robin, S. (1999). Spike dry matter and nitrogen accumulation before anthesis in wheat as affected by nitrogen fertilizer : relationship to kernels per spike. *Field Crops Research*, 64(3) :249–259.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898) :700–707.
- Distelfeld, A., Korol, A., Dubcovsky, J., Uauy, C., Blake, T., and Fahima, T. (2008). Co-linearity between the barley grain protein content (GPC) QTL on chromosome arm 6HS and the wheat Gpc-B1 region. *Molecular Breeding*, 22(1) :25–38.
- Distelfeld, A., Li, C., and Dubcovsky, J. (2009). Regulation of flowering in temperate cereals. *Current opinion in plant biology*, 12(2) :178–184.
- Dreccer, M., Grashoff, C., and Rabbinge, R. (1997). Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling : effects on senescence and grain protein concentration. *Field Crops Research*, 49(2-3) :269–277.
- Dubcovsky, J. (2004). Marker-assisted selection in public breeding programs : the wheat experience. *Crop Science*, 44(6) :1895–1898.
- Dubcovsky, J. and Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833) :1862.
- Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L., and Tranquilli, G. (1998). Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 97(5) :968–975.

- Dubé, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., et al. (2005). The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations : a systematic review. *Gastroenterology*, 128(4) :S57–S67.
- Dubois, J. and Fossati, A. (1981). Influence of nitrogen uptake and nitrogen partitioning efficiency on grain yield and grain protein concentration of twelve winter wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). *Zeitung Pflanzenzüchtg.*
- Dupont, F. and Altenbach, S. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*, 38(2) :133–146.
- Dupont, F., Hurkman, W., Vensel, W., Tanaka, C., Kothari, K., Chung, O., and Altenbach, S. (2006). Protein accumulation and composition in wheat grains : effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy*, 25(2) :96–107.
- Dutilleul, C., Lelarge, C., Prioul, J., De Paepe, R., Foyer, C., and Noctor, G. (2005). Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiology*, 139(1) :64.
- Fan, X., Jia, L., Li, Y., Smith, S., Miller, A., and Shen, Q. (2007). Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency. *Journal of experimental botany*, 58(7) :1729.
- Fedoroff, N., Battisti, D., Beachy, R., Cooper, P., Fischhoff, D., Hodges, C., Knauf, V., Lobell, D., Mazur, B., Molden, D., et al. (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century. *science*, 327(5967) :833.
- Feenstra, B., Skovgaard, I., and Broman, K. (2006). Mapping quantitative trait loci by an extension of the Haley-Knott regression method using estimating equations. *Genetics*, 173(4) :2269.
- Feil, B. (1997). The inverse yield-protein relationship in cereals : possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends Agron*, 1 :103–119.
- Fischer, R. (1985). Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *The Journal of Agricultural Science*, 105(02) :447–461.
- Fischer, R. (2007). Understanding the physiological basis of yield potential in wheat. *The Journal of Agricultural Science*, 145(2) :99.
- Fischer, R. (2008). The importance of grain or kernel number in wheat : A reply to Sinclair and Jamieson. *Field Crops Research*, 105(1-2) :15–21.
- Fitter, A., Williamson, L., Linkohr, B., and Leyser, O. (2002). Root system architecture determines fitness in an *Arabidopsis* mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 269(1504) :2017.

- Fontaine, J., Ravel, C., Pageau, K., Heumez, E., Dubois, F., Hirel, B., and Le Gouis, J. (2009). A quantitative genetic study for elucidating the contribution of glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and other nitrogen-related physiological traits to the agronomic performance of common wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 119(4) :645–662.
- Forde, B. and Walch-Liu, P. (2009). Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant, Cell & Environment*, 32(6) :682–693.
- Francki, M., Walker, E., Crawford, A., Broughton, S., Ohm, H., Barclay, I., Wilson, R., and McLean, R. (2009). Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(2) :181–191.
- Frink, C., Waggoner, P., and Ausubel, J. (1999). Nitrogen fertilizer : retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4) :1175.
- Galiba, G., Vágújfalvi, A., Li, C., Soltész, A., and Dubcovsky, J. (2009). Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science*, 176(1) :12–19.
- Gan, S. et al. (2007). *Senescence processes in plants*. Wiley Online Library.
- Gansel, X., Muñoz, S., Tillard, P., and Gojon, A. (2001). Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes AtNrt2. 1 and AtAmt1. 1 in Arabidopsis : relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal*, 26(2) :143–155.
- Gastal, F. and Lemaire, G. (2002). N uptake and distribution in crops : an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*, 53(370) :789.
- Gastal, F. and Nelson, C. (1994). Nitrogen use within the growing leaf blade of tall fescue. *Plant physiology*, 105(1) :191.
- Gegas, V., Nazari, A., Griffiths, S., Simmonds, J., Fish, L., Orford, S., Sayers, L., Doonan, J., and Snape, J. (2010). A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *The Plant Cell Online*, 22(4) :1046.
- Gelang, J., Pleijel, H., Sild, E., Danielsson, H., Younis, S., and Selldén, G. (2000). Rate and duration of grain filling in relation to flag leaf senescence and grain yield in spring wheat (*Triticum aestivum*) exposed to different concentrations of ozone. *Physiologia Plantarum*, 110(3) :366–375.
- Génard, M., Reich, M., Lobit, P., and Besset, J. (1999). Correlations between sugar and acid content and peach growth. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 74(6) :772–776.
- Giles, J. (2005). Nitrogen study fertilizes fears of pollution. *Nature*, 433(7028) :791.
- Girin, T., Lejay, L., Wirth, J., Widiez, T., PALENCHAR, P., Nazoa, P., Touraine, B., Gojon, A., and Lepetit, M. (2007). Identification of a 150 bp cis-acting element of the AtNRT2. 1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant, Cell & Environment*, 30(11) :1366–1380.

- Glass, A. (2009). Nitrate uptake by plant roots. *Botany*, 87(7) :659–667.
- Glass, A., Britto, D., Kaiser, B., Kinghorn, J., Kronzucker, H., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M., Unkles, S., et al. (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(370) :855.
- Godfrey, D., Hawkesford, M., Powers, S., Millar, S., and Shewry, P. (2010). Effects of Crop Nutrition on Wheat Grain Composition and End Use Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5) :3012–3021.
- Goffinet, B. and Gerber, S. (2000). Quantitative trait loci : a meta-analysis. *Genetics*, 155 :463–473.
- Gong, Y., Zhang, J., Gao, J., Lu, j., and Wang, J. (2005). Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 191 :292–299.
- Good, A., Shrawat, A., and Muench, D. (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in plant science*, 9(12) :597–605.
- Grant, M. and McCalla, A. (1949). Yield and protein content of wheat and barley. *Canad. J. Res. C*, 27 :230–240.
- Graybosch, R. and Peterson, C. (2010). Genetic improvement in winter wheat yields in the Great Plains of North America, 1959–2008. *Crop Science*, 50 :1882–1890.
- Greenup, A., Peacock, W., Dennis, E., and Trevaskis, B. (2009). The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Annals of Botany*.
- Gregersen, P. and Holm, P. (2007). Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 5(1) :192–206.
- Gregersen, P., Holm, P., and Krupinska, K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology*, 10 :37–49.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., and Moore, G. (2006). Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, 439(7077) :749–752.
- Griffiths, S., Simmonds, J., Leverington, M., Wang, Y., Fish, L., Sayers, L., Alibert, L., Orford, S., Wingen, L., Herry, L., et al. (2009). Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 119(3) :383–395.
- Groos, C., Robert, N., Bervas, E., and Charmet, G. (2003). Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 106(6) :1032–1040.
- Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C., and Masclaux-Daubresse, C. (2010). Senescence and death of plant organs : nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333(4) :382–391.

- Gupta, P., Varshney, R., Sharma, P., and Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant breeding*, 118(5) :369–390.
- Gupta, R., Batey, I., and MacRitchie, F. (1992). Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chemistry*, 69(2) :125–131.
- Habash, D., Bernard, S., Schondelmaier, J., Weyen, J., and Quarrie, S. (2007). The genetics of nitrogen use in hexaploid wheat : N utilisation, development and yield. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114(3) :403–419.
- Habash, D., Massiah, A., Rong, H., Wallsgrove, R., and Leigh, R. (2001). The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology*, 138(1) :83–89.
- Haile, F., Higley, L., Ni, X., and Quisenberry, S. (1999). Physiological and growth tolerance in wheat to Russian wheat aphid (Homoptera : Aphididae) injury. *Environmental Entomology*, 28(5) :787–794.
- Hammer, G., Cooper, M., Tardieu, F., Welch, S., Walsh, B., van Eeuwijk, F., Chapman, S., and Podlich, D. (2006). Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. *Trends in Plant Science*, 11(12) :587–593.
- Hanocq, E., Laperche, A., Jaminon, O., Lainé, A., and Le Gouis, J. (2007). Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114(3) :569–584.
- Harris, K., Subudhi, P., Borrell, A., Jordan, D., Rosenow, D., Nguyen, H., Klein, P., Klein, R., and Mullet, J. (2007). Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. *Journal of experimental botany*, 58(2) :327.
- Harrison, J., Hirel, B., and Limami, A. (2004). Variation in nitrate uptake and assimilation between two ecotypes of *Lotus japonicus* and their recombinant inbred lines. *Physiologia Plantarum*, 120(1) :124–131.
- Hirel, B., Bertin, P., Quillere, I., Bourdoncle, W., Attagnant, C., Delloy, C., Gouy, A., Cadiou, S., Retailliau, C., Falque, M., et al. (2001). Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology*, 125(3) :1258.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants : towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58 :2369–2387.
- Holland, J. (2007). Genetic architecture of complex traits in plants. *Current opinion in plant biology*, 10(2) :156–161.
- Huang, X., Cloutier, S., Lycar, L., Radovanovic, N., Humphreys, D., Noll, J., Somers, D., and Brown, P. (2006). Molecular detection of QTLs for agronomic and quality traits in a doubled haploid population derived from two Canadian wheats (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 113(4) :753–766.
- Hurkman, W., McCue, K., Altenbach, S., Korn, A., Tanaka, C., Kothari, K., Johnson, E., Bechtel, D., Wilson, J., Anderson, O., et al. (2003). Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. *Plant Science*, 164(5) :873–881.

- Imaizumi, T. and Kay, S. (2006). Photoperiodic control of flowering : not only by coincidence. *Trends in Plant Science*, 11(11) :550–558.
- Iqbal, M., Navabi, A., Salmon, D., Yang, R., and Spaner, D. (2007). Simultaneous selection for early maturity, increased grain yield and elevated grain protein content in spring wheat. *Plant Breeding*, 126(3) :244–250.
- Jaeger, K. and Wigge, P. (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 17(12) :1050–1054.
- Jamieson, P., Semenov, M., Brooking, I., and Francis, G. (1998). Sirius : a mechanistic model of wheat response to environmental variation. *European Journal of Agronomy*, 8(3-4) :161–179.
- Jenner, C., Ugalde, T., and Aspinall, D. (1991). The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Functional Plant Biology*, 18(3) :211–226.
- Jiang, G., He, Y., Xu, C., Li, X., and Zhang, Q. (2004). The genetic basis of stay-green in rice analyzed in a population of doubled haploid lines derived from an *indica* by *japonica* cross. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 108(4) :688–698.
- Joppa, L., Du, C., HarT, G., and Hareland, G. (1997). Mapping gene (s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Science*, 37(5) :1586–1589.
- Jourjon, M., Jasson, S., Marcel, J., Ngom, B., and Mangin, B. (2005). MCQTL : multi-allelic QTL mapping in multi-cross design. *Bioinformatics*, 21(1) :128.
- Jukanti, A. and Fischer, A. (2008). A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Physiologia Plantarum*, 132(4) :426–439.
- Justes, E., Mary, B., Meynard, J., Machet, J., and Thelier-Huche, L. (1994). Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany*, 74(4) :397.
- Kalra, N., Chakraborty, D., Sharma, A., Rai, H., Jolly, M., Chander, S., Kumar, P., Bhadraray, S., Barman, D., Mittal, R., et al. (2008). Effect of increasing temperature on yield of some winter crops in northwest India. *Current science*, 94(1) :82–88.
- Kearsey, M. and Farquhar, A. (1998). QTL analysis in plants ; where are we now ? *Heredity*, 80(2) :137–142.
- Keating, B., Carberry, P., Hammer, G., Probert, M., Robertson, M., Holzworth, D., Huth, N., Hargreaves, J., Meinke, H., Hochman, Z., et al. (2003). An overview of APSIM, a model designed for farming systems simulation. *European Journal of Agronomy*, 18(3-4) :267–288.
- Keeling, P., Bacon, P., and Holt, D. (1993). Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta*, 191(3) :342–348.
- Khowaja, F., Norton, G., Courtois, B., and Price, A. (2009). Improved resolution in the position of drought-related QTLs in a single mapping population of rice by meta-analysis. *BMC genomics*, 10(1) :276.

- Kibite, S. and Evans, L. (1984). Causes of negative correlations between grain yield and grain protein concentration in common wheat. *Euphytica*, 33(3) :801–810.
- Kichey, T., Heumez, E., Pocholle, D., Pageau, K., Vanacker, H., Dubois, F., Le Gouis, J., and Hirel, B. (2006). Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutamine synthetase. *New Phytologist*, 169(2) :265–278.
- Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F., and Le Gouis, J. (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research*, 102(1) :22–32.
- Kindred, D., Verhoeven, T., Weightman, R., Swanston, J., Agu, R., Brosnan, J., and Sylvester-Bradley, R. (2008). Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. *Journal of Cereal Science*, 48(1) :46–57.
- King, J., Gay, A., Sylvester-Bradley, R., Bingham, I., Foulkes, J., Gregory, P., and Robinson, D. (2003). Modelling cereal root systems for water and nitrogen capture : towards an economic optimum. *Annals of Botany*, 91(3) :383.
- Kislev, M. (1984). Emergence of wheat agriculture. *Paléorient*, 10(2) :61–70.
- Kreis, M., Forde, B., Rahman, S., Mifflin, B., and Shewry, P. (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of molecular biology*, 183(3) :499–502.
- Ku, M., Cho, D., Ranade, U., Hsu, T., Li, X., Jiao, D., Ehleringer, J., Miyao, M., and Matsuoka, M. (2000). Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C4 photosynthesis enzymes. *Studies in Plant Science*, 7 :193–204.
- Kulwal, P., Kumar, N., Kumar, A., Gupta, R., Balyan, H., and Gupta, P. (2005). Gene networks in hexaploid wheat : interacting quantitative trait loci for grain protein content. *Functional & integrative genomics*, 5(4) :254–259.
- Lacaze, X. and Roumet, P. (2004). Environment characterisation for the interpretation of environmental effect and genotype $\times$ environment interaction. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 109(8) :1632–1640.
- Lacerenza, J., Parrott, D., and Fischer, A. (2010). A major grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 6 influences flowering time and sequential leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 61(11) :3137–3149.
- Lam, H., Coschigano, K., Oliveira, I., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1) :569–593.
- Landjeva, S., Lohwasser, U., and Börner, A. (2010). Genetic mapping within the wheat D genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. *Euphytica*, 171(1) :129–143.

- Laperche, A., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Gardet, O., Hanocq, E., Devienne-Barret, F., and Le Gouis, J. (2007). Using genotype $\times$ nitrogen interaction variables to evaluate the QTL involved in wheat tolerance to nitrogen constraints. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 115(3) :399–415.
- Laperche, A., Devienne-Barret, F., Maury, O., Le Gouis, J., and Ney, B. (2006). A simplified conceptual model of carbon/nitrogen functioning for QTL analysis of winter wheat adaptation to nitrogen deficiency. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 113(6) :1131–1146.
- Lauer, J. and Simmons, S. (1989). Canopy light and tiller mortality in spring barley. *Crop Sci*, 29 :420–424.
- Laurie, D. and Bennett, M. (1988). The production of haploid wheat plants from wheat $\times$ maize crosses. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 76(3) :393–397.
- Law, C. and Worland, A. (1997). Genetic analysis of some flowering time and adaptive traits in wheat. *New Phytologist*, 137(1) :19–28.
- Lawlor, D. (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield : mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of experimental Botany*, 53(370) :773–787.
- Le Buanec, B. (1999). Diversité génétique des variétés de blé tendre cultivées en France au cours du vingtième siècle. Evolution variétale, données techniques et économiques. *Comptes rendus de l'académie d'agriculture française*, 85 :37–53.
- Le Gouis, J., Béghin, D., Heumez, E., and Pluchard, P. (2000). Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy*, 12(3-4) :163–173.
- Lea, U., Leydecker, M., Quillere, I., Meyer, C., and Lillo, C. (2006). Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant physiology*, 140(3) :1085–1094.
- Leflon, M., Lecomte, C., Barbottin, A., Jeuffroy, M., Robert, N., and Brancourt-Hulmel, M. (2005). Characterization of environments and genotypes for analyzing genotype $\times$ environment interaction. *Journal of Crop Improvement*, 14(1) :249–298.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Muller, C., Krapp, A., Von Wirén, N., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis : functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell Online*, 15(9) :2218.
- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J., Tillard, P., and Gojon, A. (2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant physiology*, 146(4) :2036.
- Li, C. and Dubcovsky, J. (2008). Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2. *The Plant Journal*, 55(4) :543–554.
- Li, X., Zhao, X., He, X., Zhao, G., Li, B., Liu, D., Zhang, A., Zhang, X., Tong, Y., and Li, Z. (2010). Haplotype analysis of the genes encoding glutamine synthetase plastic isoforms and their association with nitrogen-use-and yield-related traits in bread wheat. *New Phytologist*, 189(2) :449–458.

- Liao, M., Fillery, I., and Palta, J. (2004). Early vigorous growth is a major factor influencing nitrogen uptake in wheat. *Functional Plant Biology*, 31(2) :121–129.
- Lim, P., Kim, H., and Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Plant Biology*, 58(1) :115.
- Liu, K. and Tsay, Y. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO journal*, 22(5) :1005–1013.
- Manichaikul, A., Dupuis, J., Sen, S., and Broman, K. (2006). Poor performance of bootstrap confidence intervals for the location of a quantitative trait locus. *Genetics*, 174(1) :481.
- Manschadi, A., Hammer, G., Christopher, J., and DeVoi, P. (2008). Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*, 303(1) :115–129.
- Marinciu, C. and Săulescu, N. (2008). Cultivar effects on the relationship between grain protein concentration and yield in winter wheat. *Romanian Agricultural Research*, 25 :19–27.
- Martínez, D., Costa, M., and Guamet, J. (2008). Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology*, 10 :15–22.
- Martre, P., Porter, J., Jamieson, P., and Triboï, E. (2003). Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology*, 133(4) :1959–1967.
- Masclaux, C., QuillerÉ, I., Gallais, A., and Hirel, B. (2001). The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology*, 138(1) :69–81.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants : challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105 :1141–1157.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., and Orsel, M. (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology*, 10 :23–36.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., and Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 17(12) :1055–1060.
- Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A., and Stitt, M. (2001). The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco : a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant, Cell & Environment*, 24(2) :177–190.
- McIntyre, C., Mathews, K., Rattey, A., Chapman, S., Drenth, J., Ghaderi, M., Reynolds, M., and Shorter, R. (2010). Molecular detection of genomic regions associated with grain yield and yield-related components in an elite bread wheat cross evaluated under irrigated and rainfed conditions. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 120(3) :527–541.

- McNeal, F. and Berg, C. (1978). Recurrent selection for grain protein content in spring wheat. *Crop Science*, 18(5) :779–782.
- Mesfin, A., Frohberg, R., and Anderson, J. (1999). RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat. *Crop science*, 39(2) :508–513.
- Mi, G., Tang, L., Zhang, F., and Zhang, J. (2000). Is nitrogen uptake after anthesis in wheat regulated by sink size? *Field Crops Research*, 68(3) :183–190.
- Miezan, K., Finney, E., et al. (1977). Genetic and environmental effects on the grain protein content in wheat. *Crop Science*, 17(4) :591.
- Mifflin, B. and Habash, D. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*, 53(370) :979.
- Miller, A. and Zhen, R. (1991). Measurement of intracellular nitrate concentrations in Chara using nitrate-selective microelectrodes. *Planta*, 184(1) :47–52.
- Monaghan, J., Snape, J., Chojecki, A., and Kettlewell, P. (2001). The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica*, 122(2) :309–317.
- Mondal, M., Brun, W., and Brenner, M. (1978). Effects of sink removal on photosynthesis and senescence in leaves of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Physiology*, 61(3) :394.
- Monteith, J. and Moss, C. (1977). Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 281(980) :277–294.
- Munier-jolain, N. and Salon, C. (2005). Are the carbon costs of seed production related to the quantitative and qualitative performance? An appraisal for legumes and other crops. *Plant, Cell & Environment*, 28(11) :1388–1395.
- Murchie, E., Ferrario-Mery, S., Valadier, M., and Foyer, C. (2000). Short-term nitrogen-induced modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco and maize leaves. *Journal of experimental botany*, 51(349) :1349.
- Nigam, J. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of biotechnology*, 87(1) :17–27.
- Obara, M., Kajiura, M., Fukuta, Y., Yano, M., Hayashi, M., Yamaya, T., and Sato, T. (2001). Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52(359) :1209.
- O'Donovan, J., Blackshaw, R., Harker, K., Clayton, G., and Maurice, D. (2005). Field evaluation of regression equations to estimate crop yield losses due to weeds. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(4) :955–962.
- Oliphant, A., Barker, D., Stuelpnagel, J., and Chee, M. (2002). BeadArray technology : enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques*, 32 :S56–S61.

- Oscarson, P. (2000). The strategy of the wheat plant in acclimating growth and grain production to nitrogen availability. *Journal of experimental botany*, 51(352) :1921.
- Oury, F., Bérard, P., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Pluchard, P., Rousset, M., Dousinault, G., Rolland, B., Trottet, M., Giraud, A., et al. (2003). Yield and grain protein concentration in bread wheat : a review and a study of multi-annual data from a French breeding program. *Journal of Genetics and Breeding (Italy)*, 57 :59–68.
- Oury, F., Chiron, H., Faye, A., Gardet, O., Giraud, A., Heumez, E., Rolland, B., Rousset, M., Trottet, M., Charmet, G., et al. (2010). The prediction of bread wheat quality : joint use of the phenotypic information brought by technological tests and the genetic information brought by HMW and LMW glutenin subunits. *Euphytica*, 171(1) :87–109.
- Oury, F. and 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(1) :45–57.
- Palmarola-Adrados, B., Choteborská, P., Galbe, M., and Zacchi, G. (2005). Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource technology*, 96(7) :843–850.
- Parrott, D., McInnerney, K., Feller, U., and Fischer, A. (2007). Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist*, 176(1) :56–69.
- Parry, M., Canziani, O., Palutikof, J., Van Der Linden, P., and Hanson, C. (2007). IPCC, 2007 : climate change 2007 : impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
- Paterson, A., Lander, E., Hewitt, J., and Peterson, S. (1988). Lincoln, SE, and Tanksley, SD 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335 :721–726.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., et al. (2008). A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science*, 322(5898) :101.
- Payne, P. (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1) :141–153.
- Penning, V., Brunsting, A., and Van Laar, H. (1974). Products, requirements and efficiency of biosynthesis : a quantitative approach. *Journal of Theoretical Biology*, 45(2) :339.
- Pepe, J. and Robert, E. (1975). Plant height, protein percentage, and yield relationships in Sspring wheat. *Crop Science*, 15(6) :793.
- Perretant, M., Cadalen, T., Charmet, G., Sourdille, P., Nicolas, P., Boeuf, C., Tixier, M., Branlard, G., and Bernard, S. (2000). QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 100(8) :1167–1175.

- Pierre, J., Huguet, T., Barre, P., Huyghe, C., and Julier, B. (2008). Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 117(4) :609–620.
- Pinto, R., Reynolds, M., Mathews, K., McIntyre, C., Olivares-Villegas, J., and Chapman, S. (2010). Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 121 :1–21.
- Pleijel, H., Mortensen, L., Fuhrer, J., Ojanperä, K., and Danielsson, H. (1999). Grain protein accumulation in relation to grain yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in open-top chambers with different concentrations of ozone, carbon dioxide and water availability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 72(3) :265–270.
- Poitrat, E. (1999). The potential of liquid biofuels in France. *Renewable Energy*, 16(1-4) :1084–1089.
- Power, J. and Alessi, J. (1978). Tiller development and yield of standard and semidwarf spring wheat varieties as affected by nitrogen fertilizer. *The Journal of Agricultural Science*, 90(01) :97–108.
- Prasad, M., Kumar, N., Kulwal, P., Röder, M., Balyan, H., Dhaliwal, H., and Gupta, P. (2003). QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 106(4) :659–667.
- Prasad, M., Varshney, R., Kumar, A., Balyan, H., Sharma, P., Edwards, K., Dhaliwal, H., Roy, J., and Gupta, P. (1999). A microsatellite marker associated with a QTL for grain protein content on chromosome arm 2DL of bread wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 99(1) :341–345.
- Price, A., Tomos, A., and Virk, D. (1997). Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) I : a hydroponic screen. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 95(1) :132–142.
- Prudent, M., Causse, M., Génard, M., Tripodi, P., Grandillo, S., and Bertin, N. (2009). Genetic and physiological analysis of tomato fruit weight and composition : influence of carbon availability on QTL detection. *Journal of experimental botany*, 60(3) :923.
- Quarrie, S., Steed, A., Calestani, C., Semikhodskii, A., Lebreton, C., Chinoy, C., Steele, N., Pljevljakusić, D., Waterman, E., Weyen, J., et al. (2005). A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 110(5) :865–880.
- Quilot, B., Génard, M., Lescourret, F., and Kervella, J. (2005). Simulating genotypic variation of fruit quality in an advanced peach × *Prunus davidiana* cross. *Journal of experimental botany*, 56(422) :3071.
- R Development Core Team (2008). *R : A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Rajcan, I. and Tollenaar, M. (1999a). Source : sink ratio and leaf senescence in maize : I. Dry matter accumulation and partitioning during grain filling. *Field Crops Research*, 60(3) :245–253.

- Rajcan, I. and Tollenaar, M. (1999b). Source : sink ratio and leaf senescence in maize : II. Nitrogen metabolism during grain filling. *Field Crops Research*, 60(3) :255–265.
- Ravel, C., Martre, P., Romeuf, I., Dardevet, M., El-Malki, R., Bordes, J., Duchateau, N., Brunel, D., Balfourier, F., and Charmet, G. (2009). Nucleotide polymorphism in the wheat transcriptional activator *Spa* influences its pattern of expression and has pleiotropic effects on grain protein composition, dough viscoelasticity, and grain hardness. *Plant physiology*, 151(4) :2133.
- Rebai, A., Blanchard, P., Perret, D., and Vincourt, P. (1997). Mapping quantitative trait loci controlling silking date in a diallel cross among four lines of maize. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 95(3) :451–459.
- Rebetzke, G., Ellis, M., Bonnett, D., and Richards, R. (2007). Molecular mapping of genes for coleoptile growth in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114(7) :1173–1183.
- Reed, A., Below, F., and Hageman, R. (1980). Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and protease activities during grain development in maize (*Zea mays* L.) : I. Variation between genotypes. *Plant Physiology*, 66(1) :164.
- Reed, A., Canvin, D., Sherrard, J., and Hageman, R. (1983). Assimilation of ^{15}N nitrate and ^{15}N nitrite in leaves of five plant species under light and dark conditions. *Plant Physiology*, 71(2) :291.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B., and Gojon, A. (2006). The *Arabidopsis* NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50) :19206.
- Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A., and Tardieu, F. (2003). Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiology*, 131(2) :664.
- Reymond, M., Muller, B., and Tardieu, F. (2004). Dealing with the genotype $\times$ environment interaction via a modelling approach : a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. *Journal of Experimental Botany*, 55(407) :2461.
- Richard-Molard, C., Krapp, A., Brun, F., Ney, B., Daniel-Vedele, F., and Chaillou, S. (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *Journal of experimental botany*, 59 :779–791.
- Richards, R., Rebetzke, G., Condon, A., and Van Herwaarden, A. (2002). Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Science*, 42(1) :111–121.
- Robert, C., Bancal, M., Ney, B., and Lannou, C. (2005). Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytologist*, 165(1) :227–241.

- Salah, H. and Tardieu, F. (1997). Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand (a superposition of hydraulic and chemical messages?). *Plant Physiology*, 114(3) :893.
- Salse, J., Bolot, S., Throude, M., Jouffe, V., Piegu, B., Quraishi, U., Calcagno, T., Cooke, R., Delseny, M., and Feuillet, C. (2008). Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. *The Plant Cell Online*, 20(1) :11.
- Sanford, D. and MacKown, C. (1986). Variation in nitrogen use efficiency among soft red winter wheat genotypes. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 72(2) :158–163.
- Sax, K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 8(6) :552.
- See, D., Kanazin, V., Kephart, K., and Blake, T. (2002). Mapping genes controlling variation in barley grain protein concentration. *Crop Science*, 42(3) :680–685.
- Seguin, B., Brisson, N., Dupouey, J., and Loustau, D. (2002). Impact des changements climatiques sur l’agriculture et la forêt. *Le Courrier de l’environnement de l’INRA*, 46.
- Semenov, M., Martre, P., and Jamieson, P. (2009). Quantifying effects of simple wheat traits on yield in water-limited environments using a modelling approach. *Agricultural and Forest Meteorology*, 149(6-7) :1095–1104.
- Sherman, J., Lanning, S., Clark, D., and Talbert, L. (2008). Registration of near-isogenic hard-textured wheat lines differing for presence of a high grain protein gene. *Journal of Plant Registrations*, 2 :162–164.
- Shewry, P. (2009). Wheat. *Journal of experimental botany*, 60(6) :1537.
- Shewry, P., Halford, N., and Tatham Yves, A. (2003). The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Advances in food and nutrition research*, 45 :219–302.
- Shrawat, A., Carroll, R., DePauw, M., Taylor, G., and Good, A. (2008). Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant biotechnology journal*, 6(7) :722–732.
- Simmonds, N. (1995). The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(3) :309–315.
- Sinclair, T. and Jamieson, P. (2008). Yield and grain number of wheat : A correlation or causal relationship ? : Authors’ response to “The importance of grain or kernel number in wheat : a reply to Sinclair and Jamieson” by R.A. Fisher. *Field Crops Research*, 105(1-2) :22–26.
- Slafer, G., Andrade, F., and Feingold, S. (1990). Genetic improvement of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in Argentina : relationships between nitrogen and dry matter. *Euphytica*, 50(1) :63–71.
- Snape, J., Foulkes, M., Simmonds, J., Leverington, M., Fish, L., Wang, Y., and Ciavarella, M. (2007). Dissecting gene $\times$ environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica*, 154(3) :401–408.

- Soltis, P. (2005). Ancient and recent polyploidy in angiosperms. *New Phytologist*, 166(1) :5–8.
- Somers, D., Isaac, P., and Edwards, K. (2004). A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 109(6) :1105–1114.
- Sosulski, F. and Imafidon, G. (1990). Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6) :1351–1356.
- Spano, G., Di Fonzo, N., Perrotta, C., Platani, C., Ronga, G., Lawlor, D., Napier, J., and Shewry, P. (2003). Physiological characterization of stay green mutants in durum wheat. *Journal of Experimental Botany*, 54(386) :1415.
- Spielmeyer, W., Hyles, J., Joaquim, P., Azanza, F., Bonnett, D., Ellis, M., Moore, C., and Richards, R. (2007). A QTL on chromosome 6A in bread wheat (*Triticum aestivum*) is associated with longer coleoptiles, greater seedling vigour and final plant height. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 115(1) :59–66.
- Spielmeyer, W. and Richards, R. (2004). Comparative mapping of wheat chromosome 1AS which contains the tiller inhibition gene (tin) with rice chromosome 5S. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 109(6) :1303–1310.
- Spiertz, J. and De Vos, N. (1983). Agronomical and physiological aspects of the role of nitrogen in yield formation of cereals. *Plant and soil*, 75(3) :379–391.
- Storlie, E., Ihry, R., Baehr, L., Tieszen, K., Engbers, J., Anderson-Daniels, J., Davis, E., Gilbertson, A., Harden, N., Harris, K., et al. (2009). Genomic regions influencing gene expression of the HMW glutenins in wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 118(2) :295–303.
- Su, Z., Hao, C., Wang, L., Dong, Y., and Zhang, X. (2010). Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 122(1) :211–223.
- Sung, S. and Amasino, R. (2005). Remembering winter : toward a molecular understanding of vernalization. *Plant Biology*, 56(1) :491.
- Suprayogi, Y., Pozniak, C., Clarke, F., Clarke, J., Knox, R., and Singh, A. (2009). Identification and validation of quantitative trait loci for grain protein concentration in adapted Canadian durum wheat populations. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 119(3) :437–448.
- Tanksley, S., Young, N., Paterson, A., and Bonierbale, M. (1989). RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science. *Nature Biotechnology*, 7(3) :257–264.
- Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, P., Granier, C., and Muller, B. (2000). Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves : a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 51(350) :1505.

- Tashiro, T. and Wardlaw, I. (1990). The response to high temperature shock and humidity changes prior to and during the early stages of grain development in wheat. *Functional Plant Biology*, 17(5) :551–561.
- Thomas, H. and Howarth, C. (2000). Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany*, 51(Special Issue) :329.
- Thomas, H. and Stoddart, J. (1980). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1) :83–111.
- Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion : the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11) :5995.
- Tollenaar, M. and Daynard, T. (1982). Effect of source-sink ratio on dry matter accumulation and leaf senescence of maize. *Canadian Journal of Plant Science (Canada)*.
- Triboï, E., Martre, P., Girousse, C., Ravel, C., and Triboï, Blondel, A. (2006). Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy*, 25(2) :108–118.
- Triboï, E., Martre, P., and Triboï, Blondel, A. (2003). Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany*, 54(388) :1731.
- Triboï, E. and Ntonga, J. (1993). Effet de l'azote et du rayonnement sur le développement des feuilles et de l'épi chez le blé d'hiver : mise en place de l'appareil foliaire et de la structure de l'épi. *Agronomie*, 13(4) :253–265.
- Triboï, E. and Triboï, Blondel, A. (2002). Productivity and grain or seed composition : a new approach to an old problem—invited paper. *European Journal of Agronomy*, 16(3) :163–186.
- Tsay, Y., Schroeder, J., Feldmann, K., and Crawford, N. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72(5) :705–713.
- Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szecowka, M., Nunes-nesi, A., Fernie, A., Koehl, K., and Stitt, M. (2009). Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 32(3) :300–318.
- Turner, A., Bradburne, R., Fish, L., and Snape, J. (2004). New quantitative trait loci influencing grain texture and protein content in bread wheat. *Journal of Cereal Science*, 40(1) :51–60.
- Uauy, C., Brevis, J., and Dubcovsky, J. (2006). The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *Journal of experimental botany*, 57(11) :2785.
- van Eeuwijk, F., Bink, M., Chenu, K., and Chapman, S. (2010). Detection and use of QTL for complex traits in multiple environments. *Current opinion in plant biology*, 13(2) :193–205.

- Varshney, R. and Dubey, A. (2009). Novel genomic tools and modern genetic and breeding approaches for crop improvement. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(2) :127–138.
- Verhoeven, K., Jannink, J., and McIntyre, L. (2005). Using mating designs to uncover QTL and the genetic architecture of complex traits. *Heredity*, 96(2) :139–149.
- Verma, V., Foulkes, M., Worland, A., Sylvester-Bradley, R., Caligari, P., and Snape, J. (2004). Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica*, 135(3) :255–263.
- Veyrieras, J., Goffinet, B., and Charcosset, A. (2007). MetaQTL : a package of new computational methods for the meta-analysis of QTL mapping experiments. *BMC bioinformatics*, 8(1) :49.
- Vijayalakshmi, K., Fritz, A., Paulsen, G., Bai, G., Pandravada, S., and Gill, B. (2010). Modeling and mapping QTL for senescence-related traits in winter wheat under high temperature. *Molecular Breeding*, pages 1–13.
- Voorrips, R. (2002). MapChart : software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1) :77.
- Waters, B., Uauy, C., Dubcovsky, J., and Grusak, M. (2009). Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *Journal of experimental botany*, 60(15) :4263.
- Wieser, H. and Seilmeier, W. (1998). The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(1) :49–55.
- Wingler, A., Purdy, S., Edwards, S., Chardon, F., and Masclaux-Daubresse, C. (2010). QTL analysis for sugar-regulated leaf senescence supports flowering-dependent and-independent senescence pathways. *New Phytologist*, 185(2) :420–433.
- Wrigley, C., Du Cros, D., Fullington, J., and Kasarda, D. (1984). Changes in polypeptide composition and grain quality due to sulfur deficiency in wheat. *Journal of cereal science*, 2(1) :15–24.
- Wuest, S. and Cassman, K. (1992). Fertilizer-nitrogen use efficiency of irrigated wheat. I : Uptake efficiency of preplant versus late-season application. *Agronomy journal*, 84(4) :682–688.
- Xue, S., Zhang, Z., Lin, F., Kong, Z., Cao, Y., Li, C., Yi, H., Mei, M., Zhu, H., Wu, J., et al. (2008). A high-density intervarietal map of the wheat genome enriched with markers derived from expressed sequence tags. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 117(2) :181–189.
- Yamaya, T., Obara, M., Nakajima, H., Sasaki, S., Hayakawa, T., and Sato, T. (2002). Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of experimental botany*, 53(370) :917.

- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., and Dubcovsky, J. (2006). The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51) :19581.
- Yang, J. and Zhang, J. (2006). Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist*, 169(2) :223–236.
- Yin, L., Li, P., Wen, B., Taylor, D., and Berry, J. (2007). Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (TaNRT2. 1) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NTR2 genes. *Plant Science*, 172(3) :621–631.
- Yin, X., Struik, P., Van Eeuwijk, F., Stam, P., and Tang, J. (2005). QTL analysis and QTL-based prediction of flowering phenology in recombinant inbred lines of barley. *Journal of Experimental Botany*, 56(413) :967.
- Zadoks, J., Chang, T., and Konzak, C. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14(6) :415–421.
- Zanetti, S., Winzeler, M., Feuillet, C., Keller, B., and Messmer, M. (2001). Genetic analysis of bread-making quality in wheat and spelt. *Plant Breeding*, 120(1) :13–19.
- Zhang, C., Chen, G., Gao, X., and Chu, C. (2006). Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties. *South African Journal of Botany*, 72(1) :15–23.
- Zheng, B., Le Gouis, J., Daniel, D., and Brancourt-Hulmel, M. (2009). Optimal numbers of environments to assess slopes of joint regression for grain yield, grain protein yield and grain protein concentration under nitrogen constraint in winter wheat. *Field Crops Research*, 113(3) :187–196.
- Zhenlin, W., Yanping, Y., Mingrong, H., and Hongming, C. (1998). Source-sink manipulation effects on postanthesis photosynthesis and grain setting on spike in winter wheat. *Photosynthetica*, 35(3) :453–459.
- Zohary, D. and Hopf, M. (1988). *Domestication of plants in the Old World*. Oxford. : Clarendon Press.

Résumé

Le rendement en grains (Rdt) et la teneur en protéines (%Prot) sont deux cibles majeures dans les programmes de sélection variétale chez le blé car ces caractères contribuent à la valeur économique de cette culture. Malheureusement, leur amélioration simultanée est empêchée par la relation négative %Prot-Rdt. Il a été montré que l'écart à cette relation ("*Grain Protein Deviation*", GPD) est déterminé en partie génétiquement et serait utile pour modifier cette relation négative mais ses bases biologiques restent mal comprises à ce jour.

Nous avons montré que le GPD est principalement relié à la variabilité génétique pour l'absorption d'azote post-floraison (ABSN) dans les conditions agro-climatiques du Nord-Ouest de l'Europe. Nous proposons que la variabilité génétique pour l'accès à l'azote du sol (architecture et fonctionnement racinaire) ou pour la régulation de ABSN par le statut azoté (transport et assimilation de l'azote) pourrait expliquer le GPD.

Etant donné que le retardement de la sénescence durant la période post-floraison peut résulter en une augmentation de ABSN, nous avons analysé les déterminants génétique des relations entre durée de sénescence des feuilles après floraison et Rdt ou %Prot, observées au niveau phénotypique, en utilisant des données acquises sur une population de cartographie de blé cultivée au sein d'un large réseau expérimental. Une association positive entre durée de sénescence des feuilles après floraison et %Prot ou Rdt a été observée selon les environnements étudiés. Nous faisons l'hypothèse que l'impact d'un retardement de la sénescence des feuilles après floraison pourrait être modulé selon la disponibilité en azote durant cette période, ce qui conduirait à modifier la relation %Prot-Rdt selon les environnements étudiés.

Enfin, des données obtenues sur trois populations de cartographie cultivées dans un large réseau expérimental ont permis de suggérer, après méta-analyse de QTL, des régions génomiques potentiellement utiles en sélection pour améliorer la %Prot sans diminuer le Rdt. Ceci a permis de mettre en avant des régions situées sur les chromosomes 2A et 3B. En particulier, la région située sur le 2A pourrait être reliée à la présence d'un gène codant pour une glutamine synthétase chloroplastique qui a été associée à la variabilité génétique pour %Prot chez le blé tendre dans une étude antérieure.

Mots-clés :

Triticum aestivum L., rendement en grains, teneur en protéines, absorption et remobilisation d'azote, sénescence, QTL

Abstract

Grain yield (GY) and grain protein concentration (GPC) are two major targets in wheat breeding programs as these traits contribute to the economic value of the wheat crop. Unfortunately, their simultaneous improvement is hampered by the genetic negative GPC-GY relationship. It has been shown that the deviation to this relationship ("*Grain Protein Deviation*", GPD) has a genetic basis and might be useful to shift this negative relationship but its biological bases remain unclear.

GPD was shown to be mainly related to the genetic variability for post-anthesis nitrogen (N) uptake (PANU) in the North-West European agro-climatic conditions. We proposed that the genetic variability for the access to N in the soil (root architecture and functioning) or for the regulation of PANU by the plant N status (N transport and assimilation) could explain GPD.

As delaying leaf senescence during the post-anthesis period might result in increasing PANU, we analysed the genetic determinants of the phenotypic relationships between leaf senescence duration after anthesis and GPC or GY using data obtained on a wheat mapping population grown in a large mutli-environment trial network. A positive association was found between leaf senescence duration and GPC or GY depending on the environment. We suggested that the impact of delaying leaf senescence after anthesis on GY or GPC might be modulated by the N availability during the post-anthesis period and would lead to modify the GPC-GY relationship depending on the considered environments.

Finally, data obtained on three connected mapping populations grown in a large mutli-environment trial network were used to suggest by meta-QTL analysis potential genomic regions possibly useful in wheat breeding to improve GPC without reducing GY. This put forward genomic regions located on the 2A and 3B chromosomes as potentially interesting targets to improve GPC. In particular, the region on the 2A might be related to a chloroplastic glutamine synthetase gene previously shown to be associated with genetic variability for GPC in bread wheat.

Keywords :

Triticum aestivum L., grain yield, grain protein concentration, N uptake and remobilisation, senescence, QTL