



HAL
open science

Caractérisation et sélection de matériel innovant du noyer - De la génomique à la sélection variétale

Anthony Bernard, Morgane Vincent, Joris Molina, Celestine Foussard, Nicolas Jammes, Fabrice Lheureux, Julie Crabier, Marine Blouin-Delmas, Teresa Barreneche, Elisabeth Dirlewanger

► **To cite this version:**

Anthony Bernard, Morgane Vincent, Joris Molina, Celestine Foussard, Nicolas Jammes, et al.. Caractérisation et sélection de matériel innovant du noyer - De la génomique à la sélection variétale. Infos CTIFL, 2020, 364, pp.32-41. hal-03321476

HAL Id: hal-03321476

<https://hal.inrae.fr/hal-03321476>

Submitted on 17 Nov 2023

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.

CARACTÉRISATION ET SÉLECTION DE MATÉRIEL VÉGÉTAL INNOVANT DU NOYER

DE LA GÉNOMIQUE À LA SÉLECTION VARIÉTALE

RÉSUMÉ

Débuté en 2017, le projet « INNOV'noyer » porté par le CTIFL visait à étudier les ressources génétiques du noyer disponibles à l'INRAE de Nouvelle-Aquitaine-Bordeaux. Aujourd'hui, ce large panel de diversité a été caractérisé de la fleur au fruit et pourra représenter le matériel végétal de départ pour initier de nouveaux travaux d'évaluation d'idéotypes. En parallèle, ce panel a permis d'identifier des zones de génome en lien avec les principaux caractères d'intérêt agronomique, lesquelles sont essentielles pour créer du nouveau matériel résilient aux changements climatiques, économiques et sociétaux à venir.

CHARACTERIZATION AND SELECTION OF INNOVATIVE WALNUT PLANT MATERIAL : FROM GENOMICS TO PLANT BREEDING

The «INNOV'noyer» project, led by the CTIFL, began in 2017 and aimed at studying walnut genetic resources available at the INRAE* in the Nouvelle-Aquitaine/Bordeaux region. Today, this large range of diversity has been characterized from the flower to the fruit and may be used as stock plants to initiate new work on the evaluation of ideotypes. At the same time, this range of plant material has made it possible to identify genome zones related to the main traits of agronomic interest, which are essential for creating new plant material that is resilient to future climate, economic and societal changes.
*French National Research Institute for Agricultural, Food and Environment

Face aux bouleversements climatiques et sociétaux, l'innovation du matériel végétal est la pierre angulaire de l'évolution de la nuciculture. Les ressources génétiques du noyer et son génome commencent à livrer leurs secrets.



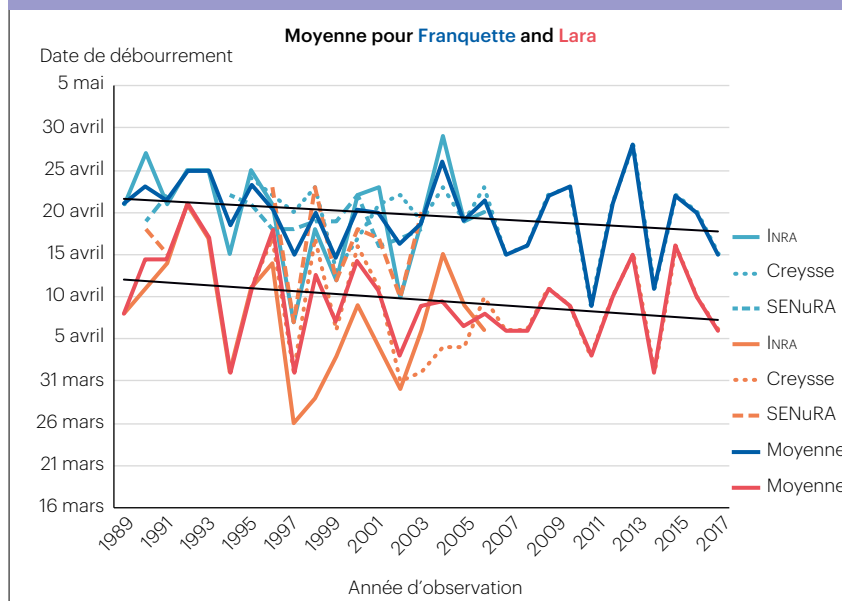
> PORTÉ PAR LE CTIFL, LE PROJET INNOV'NOYER VISE À ÉTUDIER LES RESSOURCES GÉNÉTIQUES DU NOYER

CONTEXTE ET GRANDES LIGNES DU PROJET INNOV'NOYER

La production mondiale de noix ne cesse de croître depuis les années 1970 pour dépasser les 3,8 millions de tonnes en 2017 (Source FAO 2018). La France, atteignant les 40 000 tonnes, se place en septième position, derrière un marché dominé par la Chine, les États-Unis (État de Californie) et l'Iran. Malgré tout, la noix française résiste à la concurrence, principalement en Europe, grâce à ses qualités organoleptiques et nutritionnelles reconnues. Si la noix est le deuxième fruit le plus produit en France en termes de surface avec plus de 21 000 hectares, derrière la pomme (source Agreste 2017), environ 70 % de la production est apportée par la variété « Franquette », une variété ancienne avec un rendement moyen de deux tonnes par hectare.

Éric Germain, ingénieur à l'INRAE de Bordeaux de 1977 à 2007, et son équipe, a mené deux différents programmes d'amélioration. Le premier programme (1977-1995) a conduit à la réalisation de 28 croisements entre des variétés françaises anciennes comme « Franquette », « Grand-jean » et « Marbot », appréciées pour leur saveur, et des variétés californiennes comme « Pedro » et « Chandler », connues pour leur capacité à fructifier tout le long du rameau d'un an, offrant ainsi une meilleure productivité. « Fernor » est un cultivar issu de ce programme inscrit en 1995, qui a conquis une majorité des besoins des nuciculteurs : une fructification latérale, un beau calibre, une qualité gustative

FIGURE 1 : Illustration de l'avancée de la date de débourrement



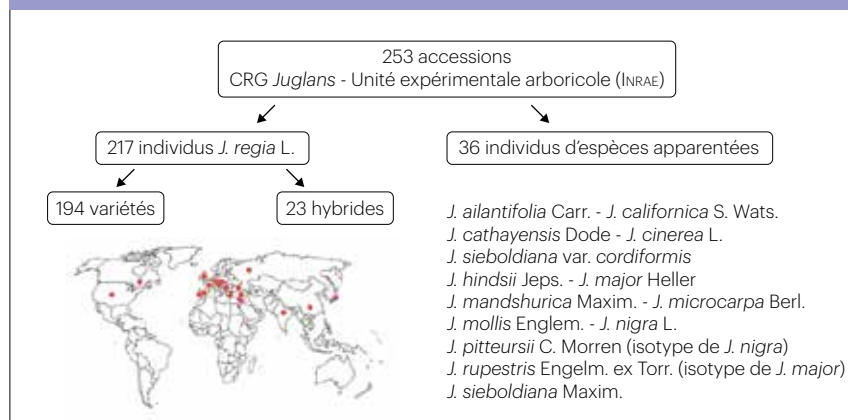
et une tardiveté de floraison. Néanmoins, ses noix restent difficiles à casser et son rendement de 3 tonnes par hectare reste inférieur à celui de « Chandler » (variété américaine), de l'ordre de 4,5 tonnes par hectare. Finalement, « Fernor » ne s'est imposé que très récemment puisqu'il domine les nouvelles plantations devant « Franquette » seulement depuis trois à quatre ans. Le second programme (1996-2007) a utilisé cette fois une collection de ressources génétiques, fruit d'un important travail de prospection aussi réalisé par Éric Germain dans différentes régions du monde. Si quelques hybrides promet-

teurs sont à ce jour en cours de caractérisation au sein des stations expérimentales de la noix de Creysse et de la SENURA (une cinquantaine en Niveau 1 et une dizaine en Niveau 2), le programme de l'INRAE a pris fin en 2007 suite à la décision de restreindre le nombre d'espèces travaillées en sélection. Aujourd'hui, la filière nucicole française est donc confrontée, d'une part, à une concurrence mondiale accrue et, d'autre part, aux effets déjà visibles du changement climatique : augmentation des températures moyennes avançant la date de débournement, risque de gelées tardives printanières et apparition de nouveaux bioagresseurs ou regain d'anciens. La figure 1, construite à partir de données d'archives d'Éric Germain, illustre bien l'avancée de la phénologie chez « Franquette » et « Lara » sur trois sites distincts (Lot : station de Creysse, Isère : SENURA et Gironde : INRAE Toulonne). Dans ce contexte, le levier génétique, en parallèle des pratiques culturales, reste indispensable pour aider le noyer à s'adapter aux conditions et contraintes futures. Les ressources génétiques végétales en général représentent donc un enjeu majeur. Jusqu'à la fin des années 1960, elles faisaient partie du bien public mais les pays développés ont commencé à exercer une pression pour reconnaître la notion de propriété intellectuelle. D'un autre côté, les pays en développement se sont inquiétés du partage des bénéfices. Cela a mené à l'adoption d'un traité sur



> EXEMPLE DE LA DIVERSITÉ CHEZ JUGLANS REGIA. A) JUGLANS REGIA VAR. PURPUREA (FEUILLAGE POURPRE) ; B) JUGLANS REGIA VAR. LACINIATA (FEUILLAGE LACINIÉ) ; C) JUGLANS REGIA VAR. PENDULA (NOYER PLEUREUR)

FIGURE 2 : Présentation de la collection de ressources génétiques du noyer de l'INRAE de Nouvelle-Aquitaine-Bordeaux



les ressources phylogénétiques en 2001 visant à la standardisation de leur caractérisation et surtout le protocole de Nagoya en 2010 qui régleme leur accès et le partage « juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation ». Si la prise de conscience du besoin de partager et de caractériser ces ressources est positive, elle ne résout toujours pas le problème de l'érosion génétique. Selon le deuxième rapport de la FAO de 2010, il existerait 7,4 millions d'accessions conservées dans plus de 1 600 banques mais une grande partie d'entre elles sont en danger car sous-financées, peu régénérées et mal caractérisées.

Il est donc important de bien manager ces ressources génétiques, de leur conservation jusqu'à leur utilisation. Et de nos jours, la génomique apporte sa contribution dans tous les processus puisqu'elle peut résoudre des questions phylogénétiques, trouver les bases génétiques des caractères d'intérêt agronomique et déterminer les accessions génétiquement proches ou redondantes. La collection de ressources génétiques de noyer de l'INRAE de Bordeaux est maintenue par le Centre de ressources génétique *Prunus/Juglans*, au sein de l'Unité expérimentale arboricole de Toulonne. Cette collection possède plus de 250 génotypes situés en verger *ex situ*. Parmi ces génotypes, on en compte 217 de noyer cultivé *J. regia* (le noyer commun) et 36 d'espèces apparentées. Au sein des 217 *J. regia*, il y a 194 cultivars et 23 des hybrides créés par l'INRAE dont certains sont encore en cours d'évaluation par les stations expérimentales de la noix de Creysse et de la SENURA. Les cultivars, comme illustré en figure 2, viennent

de toute l'aire de production du noyer, l'hémisphère nord, comme les États-Unis, l'Europe de l'Ouest et de l'Est, et l'Asie. Ce matériel végétal riche est donc la base de travail du projet INNOV'noyer.

Le CTIFL, centre opérationnel de Lanxade, en partenariat avec l'INRAE de Nouvelle-Aquitaine-Bordeaux et l'université de Davis en Californie, est à l'origine du projet « INNOV'noyer » ; projet subventionné par la région Nouvelle-Aquitaine et labellisé par le pôle de compétitivité « Agri Sud-Ouest Innovation ». Anthony Bernard, ingénieur doctorant spécialisé en biotechnologies végétales, a réalisé une thèse en contrat Cifre à l'université de Bordeaux de juin 2017 à juin 2020 dans le cadre de ce projet, visant à étudier les ressources génétiques du noyer. Ce travail s'est déroulé sous la direction de Fabrice Lheureux, chargé de programme fruits à

coque au CTIFL et Élisabeth Dirlewanger, directrice de recherche et de l'équipe A3C (Adaptation du cerisier au changement climatique) au sein de l'Unité mixte de recherche (UMR) 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRAE de Bordeaux. L'université de Davis en Californie est également un partenaire précieux pour ce projet puisqu'il est à l'origine des outils génomiques utilisés durant la thèse. Cette collaboration avec l'université de Davis s'est traduite notamment par l'accueil d'Anthony Bernard durant trois mois et l'acquisition de compétences essentielles en génétique d'association pour mener à bien ce projet. Ce séjour a été soutenu financièrement par une bourse « Initiative d'Excellence » de l'université de Bordeaux. La figure 3 illustre la richesse des différents interlocuteurs de ce projet. Ce projet avait pour buts : (1) l'évaluation de la diversité génétique et de la variabilité phénotypique au sein de la collection de ressources génétiques de l'INRAE ; et (2) l'identification du déterminisme génétique des principaux caractères d'intérêt agronomique (Lheureux, 2018). Ces deux objectifs ont concouru à l'établissement d'un socle de connaissances solides afin de développer une méthodologie s'appuyant sur les biotechnologies pour mettre en place les outils nécessaires à la réalisation d'une Sélection assistée par marqueurs (SAM) pour les principaux caractères d'intérêt agronomique. Ces outils et cette méthodologie pourront être déployés entre autres dans le cadre d'un nouveau programme de création variétale.

FIGURE 3 : Les partenaires du projet INNOV'noyer



CARACTÉRISATION PRÉCISE DE LA COLLECTION GRÂCE À UN PHÉNOTYPAGE LARGE ET INNOVANT

Avant de pouvoir mettre en exergue des zones du génome en lien avec les principaux caractères d'intérêt agronomique, il est nécessaire de caractériser le matériel végétal. En effet, le phénotype est, de manière grossière, dépendant de la génétique et de l'environnement. Le phénotypage permet donc d'apprécier si un caractère est majoritairement contrôlé par la génétique - il sera relativement constant pour une même accession au cours des années - ou par l'environnement - il variera beaucoup au cours des années -. Le premier travail entrepris durant ce projet a donc été de caractériser chaque accession de la collection par le biais d'un phénotypage large et innovant, afin d'obtenir une « carte d'identité » précise de chaque accession. Cette étape de phénotypage a été réalisée sur un très grand nombre de caractères, de la fleur au cerneau. Ainsi, la collection a d'abord été caractérisée durant deux ans

(2018 et 2019), sur des caractères liés à la phénologie (date de débourrement et de floraisons mâle et femelle). Les stades de développement sont d'une importance primordiale pour la conduite du verger. Une variété tardive permettra par exemple d'éviter les gelées printanières pouvant être préjudiciables pour la production. De plus, ce sont des indications essentielles vis-à-vis du changement climatique.

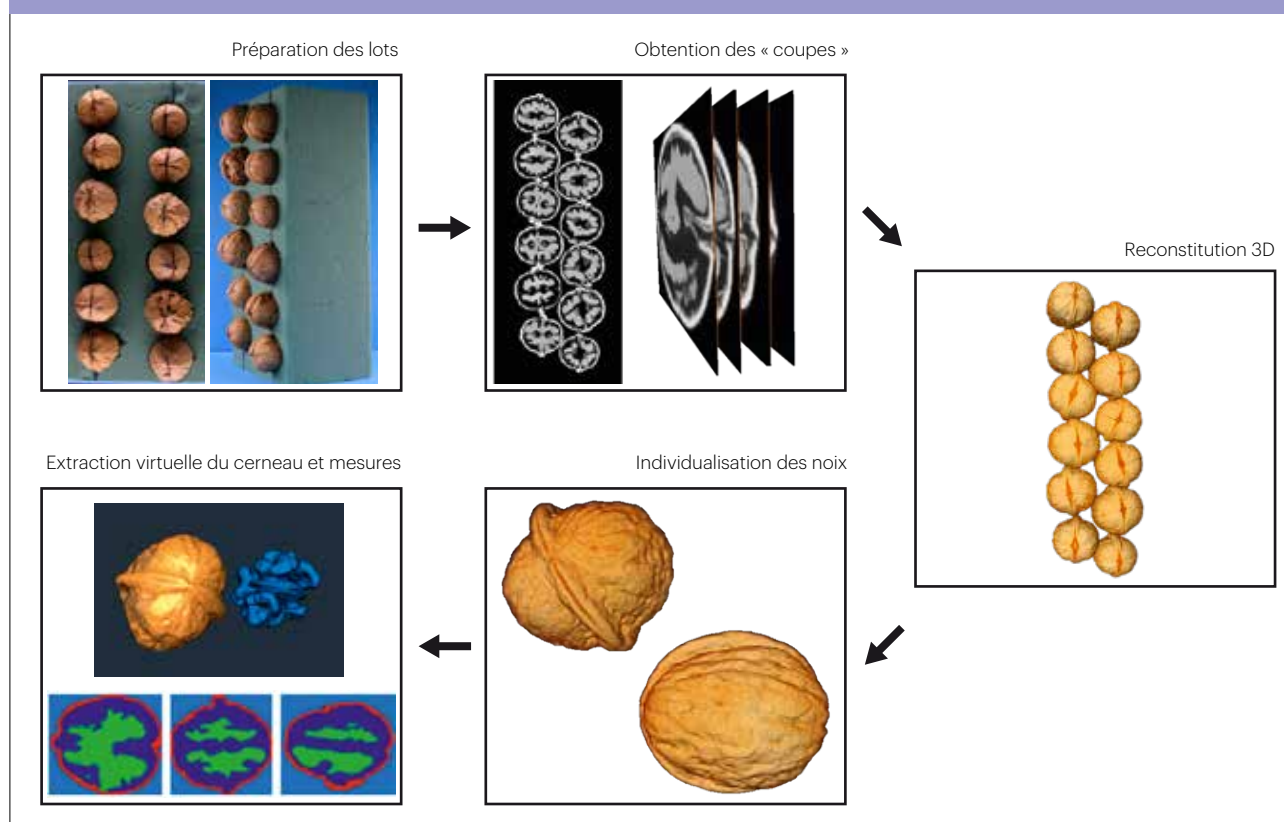
De manière évidente, les caractères liés au fruit sont tout aussi importants. La filière nucicole a besoin notamment de noix de beau calibre, de forme arrondie, ayant un énoisage aisé et possédant un taux de remplissage important. Aussi, le type de fructification latérale (fructification tout le long du rameau d'un an) est un caractère incontournable aujourd'hui pour dépasser les deux tonnes par hectare de la variété « Franquette ». Ces caractères ont été mesurés pendant trois ans, sur les récoltes 2017, 2018 et 2019. Enfin, le poids du cerneau a été également étudié, ainsi que le rendement au cassage.

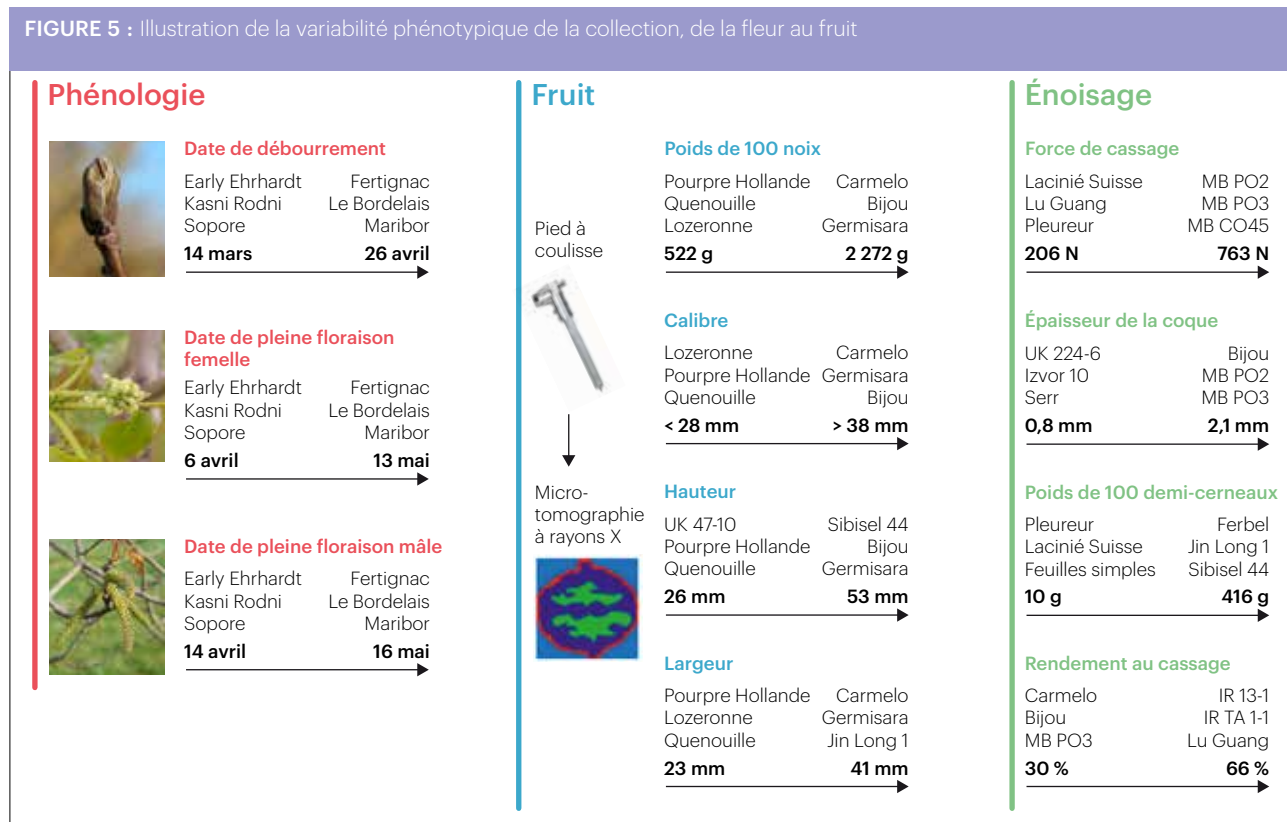
Certaines innovations ont été apportées pour réaliser ce phénotypage. Traditionnellement, les mensurations de

la noix (hauteur, largeur de face, largeur de profil, forme et épaisseur de la coque) sont obtenues à l'aide d'un pied à coulisse. Cette tâche, longue et fastidieuse à réaliser, a été repensée. Ainsi, nous avons fait appel aux techniques d'imagerie, notamment la microtomographie à rayons X présentée en figure 4. Cette technique robuste permet d'obtenir des « coupes » de la noix en deux dimensions, lesquelles seront ensuite reconstruites en trois dimensions. Il s'agit de la même technologie que la radiographie en milieu hospitalier. Un des avantages est qu'elle est non destructive ; il est possible de séparer virtuellement la coque du cerneau. Ainsi, le taux de remplissage et l'épaisseur de la coque sont obtenus sans casser la noix. Cette technique nous a également permis de quantifier la sphéricité et la rugosité de la noix, auparavant appréciées à l'œil.

Traditionnellement toujours, la mesure de la force de cassage était réalisée à la main, à l'aide d'un marteau. Cette fois, un texturomètre a été utilisé. Cet appareil est utilisé pour appliquer une force continue sur un objet et est couramment utilisé pour les mesures de fermeté des fruits.

FIGURE 4 : Présentation de la tomographie à rayons X





Des capteurs sont capables de détecter le point de rupture et donnent une valeur de force, en Newtons, nécessaire pour rompre la noix.

La figure 5 illustre la grande variabilité phénotypique de la collection. Cette richesse, dans laquelle le(la) sélectionneur(euse) pourra piocher pour créer de nouvelles variétés, est probablement l'une des plus importantes du monde chez le noyer. Pour la date de débourrement, elle s'étend sur une période d'un mois et demi, du 14 mars pour la variété « Early Ehrhardt » au 26 avril pour la variété « Maribor » en moyenne. Ceci représente une variabilité très importante à l'échelle d'une même espèce. Idem pour les dates de pleine floraison mâle et femelle. Comme pour les caractères liés à la phénologie, les mesures de taille de noix donnent beaucoup de variabilité. Par exemple, le poids de 100 noix varie du simple au quadruple tandis que la hauteur varie du simple au double, entre 26 et 53 millimètres. Concernant les caractères liés au cassage et au cerneau, encore une fois, on observe beaucoup de variabilité. La force de cassage varie entre 200 Newtons environ (la noix se casse très facilement à la main) à plus de 760 Newtons (la noix ne se casse pas sous le poids d'un homme de 65 kg !).

Il existe évidemment des corrélations positives entre les années de phénotypage. Ainsi, les variétés précoces en 2018, le restent en 2019 et en 2020. Ceci appuie l'hypothèse d'un déterminisme génétique, qu'il sera ensuite possible de repérer. Il existe également des corrélations positives entre certains caractères. Par exemple entre les caractères liés à la

phénologie comme la date de débourrement et les dates de floraison. Mais également entre la hauteur, la largeur et le poids de la noix, puis aussi entre l'épaisseur de la coque et la force de cassage. Ceci sous-entend la présence d'un déterminisme génétique proche entre ces caractères. Par exemple, il sera difficile de différencier les zones du génome



> A) VARIÉTÉ TOLÉRANTE À L'ANTHRACNOSE LIÉE À *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* ET À LA BACTÉRIOSE LIÉE À *X. ARBORICOLA* PV *JUGLANDIS* ; B) VARIÉTÉ SENSIBLE À L'ANTHRACNOSE LIÉE À *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* ET À LA BACTÉRIOSE LIÉE À *X. ARBORICOLA* PV *JUGLANDIS*

impliquées dans la date de débourrement et la date de floraison femelle. Ainsi, le(la) sélectionneur(euse) aura des difficultés pour créer une variété à débourrement tardif (évitement des gelées), mais à floraison précoce, alors qu'un cycle végétatif court est pourtant souhaité par la filière.

POINT SUR LA SENSIBILITÉ AUX MALADIES : BACTÉRIOSE ET ANTHRACNOSE

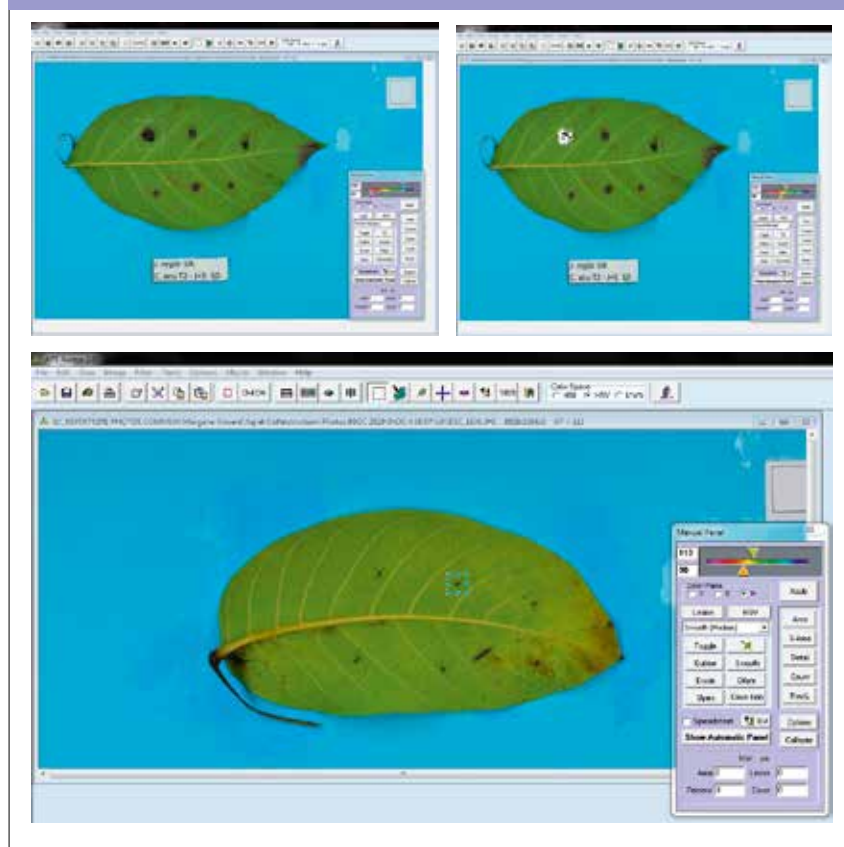
La sensibilité aux maladies est un caractère essentiel chez les espèces cultivées. Un volet du projet a été consacré à des tests de pathogénicité pour les deux principales maladies du noyer : la bactériose du noyer lié à *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* et la « Maladie de la noix noire » liée au complexe d'espèces *Colletotrichum acutatum* (Figure 6). Il n'existe aucun moyen de lutte efficace contre ces deux maladies. Les produits à base de cuivre sont utilisés contre la bactériose de manière préventive avec une efficacité toute relative liée notamment à l'apparition de souches résistantes au cuivre et dont l'usage pourrait même disparaître dans les années à venir. Seules des mesures prophylactiques telles que le broyage des résidus au sol, la suppression des fruits nécrosés, une taille conduisant à une bonne aération du verger et une bonne pénétration de la lumière, ainsi qu'une fertilisation et irrigation raisonnées, contribueront à diminuer les foyers d'infection d'une année sur l'autre. Ce dernier levier montrera toute son efficacité, associé à des cultivars tolérants (peu sensibles) à ces mêmes bioagresseurs.

Le phénotypage des symptômes est le moyen le plus simple de caractériser un matériel végétal. L'observation peut être effectuée sur le terrain en conditions naturelles d'infection, ou en conditions contrôlées après une inoculation artificielle de la maladie. La collection comptant des arbres uniques, les essais ont été faits à partir de folioles et de fruits immatures récoltés sur ces arbres, en conditions contrôlées. Une fois infecté, le matériel végétal va exprimer des symptômes plus ou moins importants. Cette expression est déterminée par l'agressivité de la souche du pathogène utilisée, des facteurs environnementaux, ainsi qu'à des moyens de défense constitutionnels ou induits chez la plante. Les mêmes conditions ont été appliquées et les mêmes souches ont été utilisées pour chaque accession afin d'identifier seu-

FIGURE 6 : Illustration des symptômes



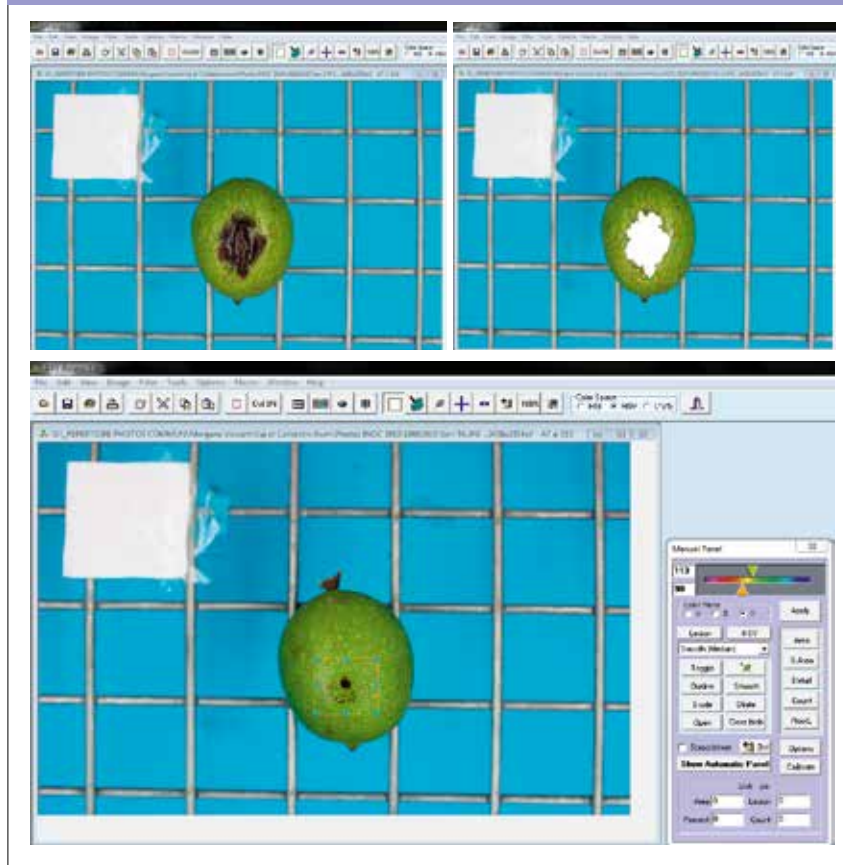
FIGURE 7 : Phénotypage des folioles par analyse d'image (APS ASSESS 2.0) après infection par *Colletotrichum acutatum*



lement l'effet de ces défenses. Une première étude concernant *C. acutatum* a ainsi débuté en 2017, portée par le centre opérationnel de Lanxade. Cet essai a permis de prouver que ce champignon était capable de provoquer des nécroses sur des folioles en conditions de laboratoire. Pour cela, le champignon a été isolé en verger sur un fruit nécrosé, puis cultivé sur un milieu artificiel. Les folioles ont ensuite été prélevées des arbres de la collection, puis inoculées artificiellement à l'aide d'une suspension de spores. Un lo-

giciel d'analyse d'image a été utilisé (APS ASSESS 2.0) afin de mesurer précisément les symptômes qui se sont développés cinq jours après infection (Figure 7). Leur gravité semblait varier d'une accession à l'autre, sans que l'on puisse établir de manière fiable une échelle de sensibilité parmi les arbres testés. Cependant, le phénotypage a mis en évidence que des variétés appartenant à des espèces apparentées du noyer commun étaient très faiblement atteintes par *C. acutatum*, à savoir le noyer cendré (*Juglans cinerea*)

FIGURE 8 : Phénotypage des fruits par analyse d'image (APS ASSESS 2.0) après infection par *Colletotrichum acutatum*



et le noyer du Japon (*Juglans sieboldiana*). Sur la base de ce constat, cette étude a été poursuivie en 2018. Cette fois-ci, des folioles mais également des fruits immatures ont été prélevés des arbres pour être testés en conditions de laboratoire. Les stades phénologiques des arbres de la collection étant relevés régulièrement, tous les échantillons ont été prélevés au même stade afin d'éliminer cette variable des résultats. L'échantillonnage s'est ainsi effectué de juin à juillet en fonction de la date de débourrement des accessions. Les résultats ont été très encourageants. Comme l'année précédente, les folioles de ces mêmes arbres ont été les moins atteintes par *C. acutatum* appartenant au noyer cendré et au noyer du Japon. Concernant les fruits une mise au point du protocole restait nécessaire. En 2019, l'expérience a été reconduite. Cette fois-ci, le champignon *C. acutatum*, mais également la bactérie *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ont été étudiés. Plusieurs accessions ont été évaluées et un classement de sensibilité a pu être

établi. Les résultats doivent être confirmés pour 2020. De manière générale, la majorité des accessions semblent plus ou moins sensibles et un faible nombre d'entre elles se situent dans les valeurs extrêmes : très sensible et peu sensible. Cependant le noyer du Japon est retrouvé parmi les accessions peu sensibles à *C. acutatum* également sur fruits. Ce qui confirme les précédentes observations sur folioles. Concernant la bactériose, des méthodes d'inoculations ont ainsi pu être testées à la fois sur fruits et sur folioles (Figure 8). Les deux essais ont provoqué des symptômes, mais les résultats entre les deux organes prélevés n'ont pas été complémentaires. De nouveaux essais seront menés dès 2020 avec un panel de souches de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* afin de valider le protocole et présenter les premiers résultats. Toutefois, les premiers résultats ou tendances, mettent en avant des tolérances assez marquées à l'antracnose liée au complexe d'espèces *Colletotrichum acutatum* et à la bactériose pour deux variétés

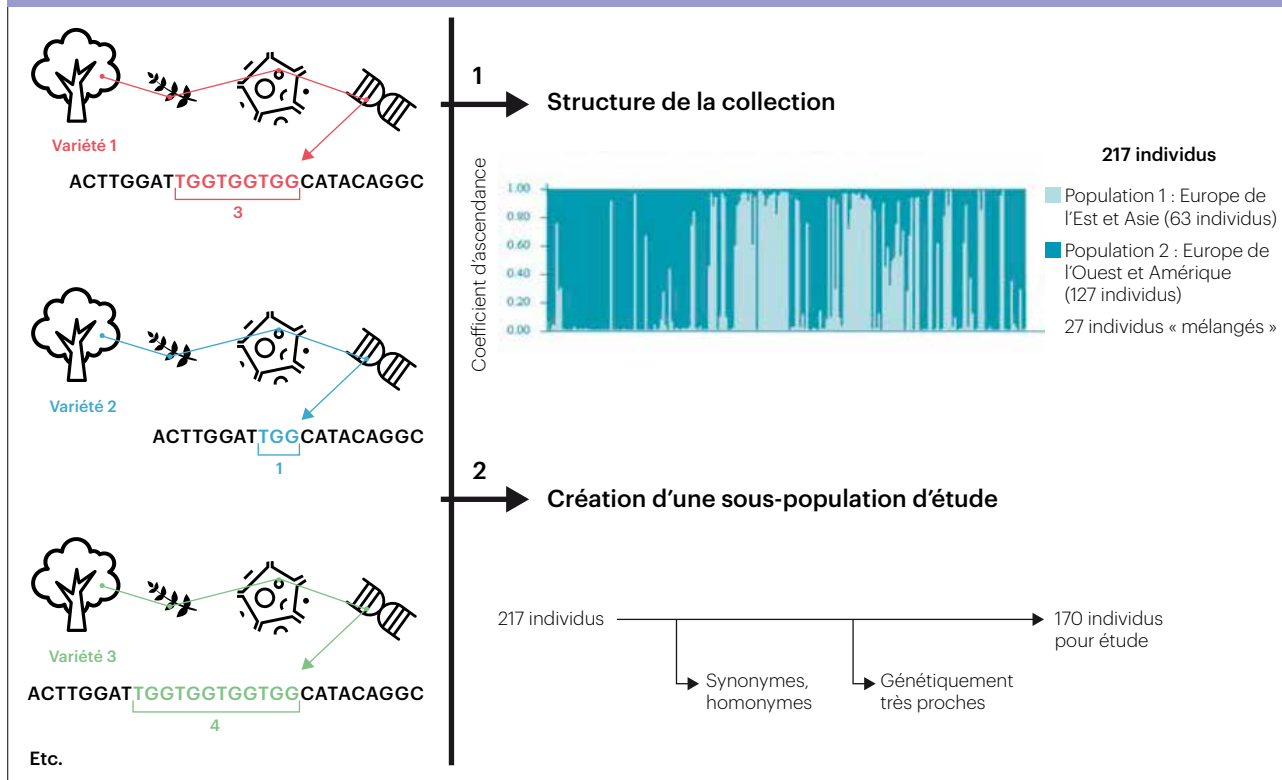
appartenant aux espèces apparentés *J. cinerea* et *J. sieboldiana* et une variété de l'espèce *J. regia*. Grâce au phénotypage des symptômes, les pistes de recherche se précisent et les premiers résultats sont encourageants concernant l'étude de la sensibilité aux maladies chez le noyer. En conclusion, nous voyons bien ici l'importance du phénotypage puisqu'il apporte deux éléments primordiaux. D'abord, il prodigue une « carte d'identité » précise et complète de chaque accession de la collection et donc, une idée des potentiels futurs géniteurs pour chaque caractère, dans un nouveau programme d'amélioration. Puis, il donne une base de données essentielle pour mener des travaux de recherche de déterminisme génétique de ces mêmes caractères.

ANALYSE ET EXPLOITATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE LA COLLECTION DE L'INRAE DE BORDEAUX

Suite à ce long travail de caractérisation phénotypique, les travaux se sont orientés sur l'analyse de la diversité génétique présente au sein de la collection, par l'utilisation de marqueurs microsatellites. En génétique, il est possible de distinguer les individus grâce à leur « polymorphisme génétique ». Un des types de polymorphisme, les « microsatellites », consiste en la répétition d'un « motif » de nucléotides dans l'ADN, comme représenté en figure 9. Cela signifie qu'à un endroit du génome, certains individus vont présenter des différences dans le nombre de répétitions de « TGG » par exemple, ces molécules de base constituant l'ADN, comme illustré en figure 9.

Treize marqueurs moléculaires ont ainsi été sélectionnés grâce à la bibliographie existante. Les résultats de ces treize marqueurs sur l'ensemble des 217 individus de la collection *J. regia* montrent d'abord que les accessions sont globalement peu hétérozygotes. Cela signifie que le niveau de consanguinité est plus élevé que la normale, dans une situation où il ne devrait exister aucun obstacle à la pollinisation croisée. Cependant, cela s'explique facilement puisqu'un certain nombre de variétés ont été développées à partir de mêmes géniteurs. Cela est souvent le cas chez les populations dites « artificielles ». Ce manque d'hétérozygotie ne constitue pas un problème en soi mais il illustre parfaitement la nécessité d'utiliser des parents très contrastés génétiquement,

FIGURE 9 : Analyse de la diversité génétique de la collection via l'utilisation de 13 marqueurs microsatellites



pour effectuer ce que l'on appelle couramment un « brassage génétique ». Le brassage génétique permettra donc d'augmenter les chances d'obtenir des variétés significativement distinctes de celles existantes en évitant les problèmes liés à la consanguinité (tares génétiques). Une autre analyse possible à réaliser avec des marqueurs microsatellites est l'analyse de la structure de la population. La figure 6 illustre de manière schématique cette analyse et montre la répartition des 217 individus uniquement *J. regia* selon le « coefficient d'ascendance ». Ici, tous les individus de la collection se répartissent en deux grands groupes, le bleu et le gris. Si nous regardons l'origine des individus de chacun de ces deux groupes, nous remarquons que la population en gris regroupe les individus d'Europe de l'Est et d'Asie (Iran, Chine, Japon, Inde, etc.), tandis que la population en bleu regroupe les individus d'Europe de l'Ouest et d'Amérique (France, Angleterre, Espagne, États-Unis, etc.). Donc le polymorphisme génétique observé est directement en lien avec l'origine géographique des individus. Cette information vient confirmer nos précédentes découvertes, cette structure sera à prendre en compte pour

augmenter l'efficacité d'un croisement contrôlé dans le cadre de tout nouveau programme de création variétale. En effet, il s'agira alors de « brasser » la diversité génétique en piochant des géniteurs potentiels au sein de ces deux différents groupes. De nouvelles informations importantes peuvent être obtenues si une analyse de la structure est conduite séparément sur chacun de deux groupes. Par exemple, dans le groupe des individus d'Europe de l'Ouest et d'Amérique, nous pouvons remarquer une particularité des variétés traditionnelles françaises. Les variétés de Corrèze et de Dordogne comme « Corne », « Grosvert », « Verdelet » et « Saint-Jean », sont plus proches génétiquement de certaines variétés espagnoles. Alors que les variétés d'Isère comme « Meylannaise », « Mayette » et « Franquette » forment un groupe à part avec les variétés américaines, qui possèdent pour un bon nombre d'entre elles, « Franquette » dans leur ascendance (Bernard, 2018). L'analyse de diversité a pu montrer quels individus étaient redondants (synonymes, homonymes) ou génétiquement très proches. Ainsi, parmi tous les individus, nous avons pu choisir 170 accessions uniques pour entamer un travail de détermination de l'ar-

chitecture génétique des principaux caractères d'intérêt agronomique chez le noyer.

DÉTERMINATION DE L'ARCHITECTURE GÉNÉTIQUE DES PRINCIPAUX CARACTÈRES

Afin de déterminer cette architecture, ou déterminisme génétique des caractères (les zones du génome impliquées dans leur variation que l'on appelle les QTLs pour Quantitative Trait Locus), il est nécessaire d'avoir à la fois des données sur le phénotype et des données sur le génotype. La façon de procéder la plus couramment utilisée est le croisement entre deux parents qui se différencient sur le caractère à étudier ; par exemple, débourrement tardif et débourrement précoce. Nous allons ensuite chercher dans la descendance la ségrégation du caractère pour trouver les fameux QTLs. Une autre solution existe, il s'agit de la génétique d'association qui utilise des individus non apparentés n'ayant aucun ou peu de liens les uns des autres. Cette méthode s'appelle la GWAS (Genome-Wide Association Study). C'est donc par l'utilisation de toutes les ressources génétiques que cela fonc-

tionne. Un des avantages majeurs est que l'on ne se restreint pas à un petit nombre de caractères comme dans un croisement, mais on peut étudier tous les caractères pouvant varier au sein de la collection. Dans notre cas, la collection permet d'étudier la taille du fruit, le poids du fruit, la date de débournement, la facilité d'énosage, etc., en combinant ce phénotypage avec un génotypage à haute densité.

Les marqueurs microsatellites cités précédemment peuvent donner de l'information, mais ne sont pas suffisants dans le cadre d'une analyse à grande échelle telle que la génétique d'association. Nous avons besoin de milliers de marqueurs simultanément, pour « capturer » l'ensemble du polymorphisme génétique d'un génome entier. Classiquement, cela passe par l'utilisation de marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Cette fois, contrairement aux microsatellites, les différences ne se traduisent pas dans le nombre de répétitions d'un motif de nucléotides, mais par le changement d'un seul nucléotide, à des centaines de milliers d'endroits dans le génome. Dans notre cas, l'université de Davis en Californie et la société Affymetrix® ont mis au point une « puce » de plus de 600 000 marqueurs sur le noyer.

La GWAS se base sur des modèles mathématiques qui combinent les données de phénotypage et les données de génotypage de la puce. L'objectif est de mettre en évidence certains SNP, qui possèdent un effet significatif expliquant la variation d'un caractère.

La figure 10 est appelée un diagramme de Manhattan en raison de la forme qui rappelle la silhouette des tours d'une grande métropole. Cette représentation permet de savoir si un SNP, représenté par un point,



> MULTIPLICATION DE LA CORE COLLECTION POUR UNE NOUVELLE IMPLANTATION, ET LA RÉALISATION DE TESTS HORS SOL VISANT À ÉVALUER LA SENSIBILITÉ DES VARIÉTÉS À DES STRESS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES

se trouve au-dessus du seuil de significativité. Si c'est le cas, il y a une association probable entre le caractère et ce SNP ; d'où le nom de génétique d'association. Cela signifie que ce SNP est dans, ou proche, d'un des gènes impliqués dans ce caractère. Ainsi, pour la date de débournement, une association très significative est présente sur le début du chromosome 1. Des associations secondaires sur les chromosomes 2, 4, 8 et 15 sont également observées. Cela montre que la date de débournement est un phénomène complexe contrôlé par une multitude de mécanismes biologiques et donc, certainement de nombreux gènes sous-jacents (Bernard, 2020a).

En multipliant ces analyses sur l'ensemble des données de phénotypage, il est possible de déterminer l'architecture générale des caractères d'intérêt agronomique chez le noyer, comme proposé sur la figure 8. Les zones majeures sont repré-

sentées et nous pouvons par exemple observer que le type de fructification (e), est déterminé par un gène majeur positionné sur le centromère (le milieu) du chromosome 11. Nous savons ainsi que le poids de la noix (h) est un caractère complexe contrôlé, entre autres, par des gènes sur la fin du chromosome 2, le début du chromosome 6, le début du chromosome 10 et le début du chromosome 14.

Dès qu'une association est observée entre un caractère et un marqueur, il est alors nécessaire de la vérifier sur d'autres matériels végétaux. Dans ce projet, la collaboration avec l'université de Davis a permis de vérifier l'association du début du chromosome 1 avec la date de débournement, sur des accessions issues de la collection américaine. Concrètement, au niveau de la séquence d'ADN des noyers, le nucléotide A (on parle d'allèle A) est lié à un débournement tardif, tandis que l'allèle C est lié à un débournement précoce. Cette association ainsi vérifiée et validée devient alors un outil de travail concret pour le-la sélectionneur-euse. Le marqueur lié au type de fructification (« e » dans la figure 11) a été également validé avec l'université de Davis. Les autres marqueurs et caractères associés restent à valider. L'étape suivante consistera à transformer ces marqueurs en outils utilisables en routine ; on parle communément aujourd'hui de marqueur « KASP », liés à la technologie de ce nom. Ces nouveaux outils permettent de sélectionner et/ou d'évaluer des variétés à un stade très juvénile avant même l'expression des caractères recherchés.

FIGURE 10 : Diagramme de Manhattan pour la date de débournement

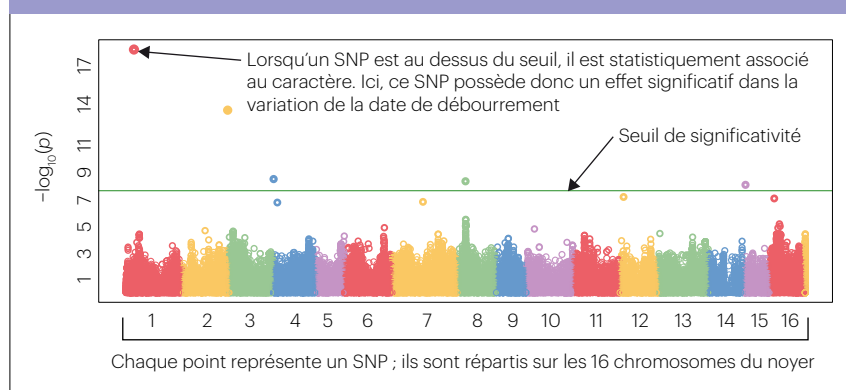
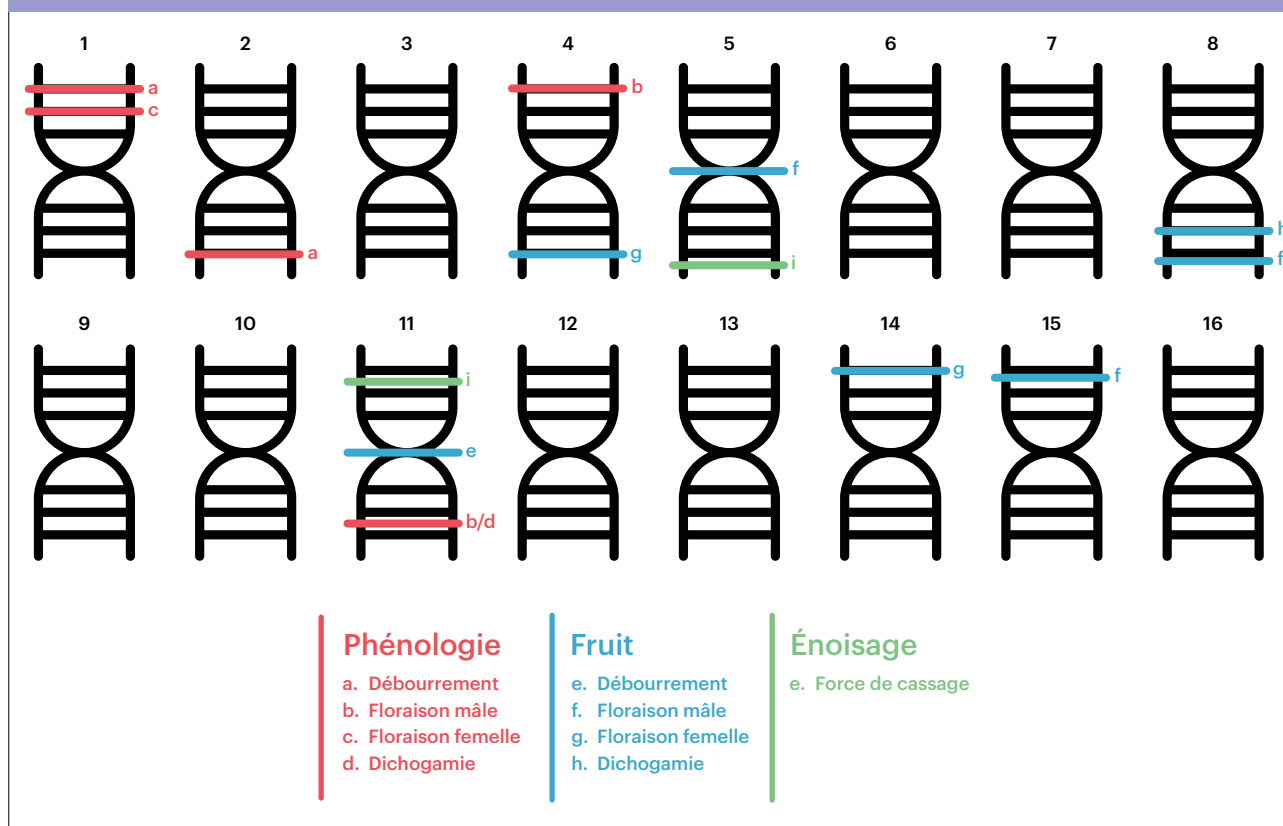


FIGURE 11 : Architecture génétique des principaux caractères d'intérêt agronomique chez le noyer



LES RETOMBÉES CONCRÈTEMENT POUR LA FILIÈRE

Au soir de ce projet, le bilan en termes de livrables, pour reprendre la terminologie des Appels à projet (AAP), va au-delà de ce que nous avions espéré. Tout d'abord, les 6 publications dans des revues internationales à comité de lecture (Bernard, 2017, 2018a, 2019, 2020a, 2020b, 2020c) et les trois communications orales dans trois symposiums internationaux (Lheureux, 2017 ; Bernard, 2018b, 2020d), ont permis de nous repositionner sur le devant de la scène internationale en recherche et développement sur cette espèce, et de réapparaître comme un partenaire et/ou un interlocuteur à nouveau incontournable, « putatif », dans les futurs projets internationaux. Ensuite, nous avons bâti une nouvelle base de données abritée par RnDExp et riche des archives complétées par de nouvelles observations de la collection réalisées ces trois dernières années. Cette base de données, associée à l'analyse génomique de la collection, a permis de mettre en évidence des marqueurs moléculaires et régions

du génome pour cinq caractères importants pour la filière. Nous avons transféré, modernisé, voire développé des outils de phénotypage pour évaluer les variétés plus rapidement et de façon plus précise pour certains caractères (texturomètre, tomographie à rayons X, évaluation de la sensibilité des variétés à deux maladies par inoculation sur organes détachés et analyses d'images).

Fort de cette connaissance, d'une nouvelle méthodologie acquise et des nouveaux outils développés, nous sommes en mesure d'apporter notre support à la filière nucicole à un nouveau programme d'innovation variétale plus efficient. Le choix des géniteurs dans les croisements sera mieux ciblé et la sélection assistée des marqueurs moléculaires permettra l'identification très précocement d'hybrides possédant des caractères intéressants tels que le type de fructification, un débourrement tardif, un beau calibre, un taux de remplissage élevé et une force nécessaire pour casser la noix, optimal (libérant un maximum de cerneaux valides). Si la variété parfaite n'existe pas, cette nouvelle approche permettra de créer

une gamme variétale d'idéotypes répondant aux différents contextes environnementaux (pédoclimatiques) et sociétaux rencontrés sur les zones historiques de production de la noix et les nouvelles. La base de données « noyer » nouvellement créée servira de référence aux observations futures et nous permettra d'appréhender et/ou de mieux comprendre l'impact du changement climatique sur les arbres. Cette information pourra être retransmise aux producteurs pour les guider dans le choix variétal lors de leurs nouvelles plantations ou adapter des pratiques culturales qui contrebalanceront (si possible) les effets plus ou moins négatifs des changements climatiques sur leurs vergers déjà installés. Par ailleurs, toujours à l'aide de cette même base de données associée aux marqueurs moléculaires, nous serons en mesure de mieux évaluer ou améliorer la connaissance des quelques variétés développées à l'étranger et susceptibles d'être implantées chez nous, voire identifier de nouveaux géniteurs ou cultivars au travers une nouvelle prospection en France, ou plus largement en Europe car le noyer y est installé depuis

CE QU'IL FAUT RETENIR

Ce projet confirme la richesse et la valeur inestimable de la collection de noyer développée par Éric Germain, de l'INRAE de Bordeaux, pour l'avenir de la filière et lui permet d'affronter les bouleversements environnementaux et sociaux qui s'opèrent actuellement.

Cette étude a permis :

- d'appréhender la diversité génétique de cette collection pour l'exploiter le plus efficacement ;
- de moderniser et développer de nouveaux outils de phénotypage ;
- d'améliorer notre connaissance sur la phénologie du noyer ;
- d'identifier des régions du génome qui gouvernent des caractères agronomiques importants et développer des outils moléculaires qui pourront contribuer à la mise à place d'un nouveau programme d'innovation variétale plus efficient ;
- de repositionner la recherche et le développement française sur cette espèce et sur des nouveaux savoir-faire face à d'autres structures d'importance internationale.

la nuit des temps.

Ce projet constitue une avancée notable sur l'amélioration de nos connaissances des variétés de noyer et notre capacité à les évaluer et sélectionner de façon plus efficiente, mais de nombreux aspects/points restent encore à approfondir. En effet, ces points font référence à une actualité forte qui sont les changements climatiques et la gestion des bioagresseurs. Il est important de parfaire notre connaissance sur le comportement des variétés dans différents contextes pédo-climatiques et notamment sur l'impact ou le poids de l'environnement sur l'expression même du génome des variétés et tout particulièrement sur les associations que nous avons mis en évidence au travers ce projet. En effet, Il est acquis que l'environnement peut modifier l'expression même des gènes au travers de mécanismes dits épigénétiques. La mise en place d'un réseau national de vergers comprenant la Core collection réduite complétée par les nouvelles variétés françaises voire européennes permettrait d'apporter des éléments de réponse sur l'impact des conditions pédo-climatiques sur la phénologie. La conduite de ces vergers en bas intrant, permettra également d'évaluer toujours dans différents contextes, la sensibilité aux bioagresseurs affectant actuellement la noyeraie française, voir à de nouvelles maladies ou ravageurs qui apparaîtraient suite aux évolutions climatiques. Ce dispositif associé à des études plus approfondies en laboratoire permettrait d'identifier de nouveaux marqueurs ou régions du génome liés à

divers caractères tels que : (1) les besoins en froid et chaleur (phase d'endo- et éco-dormance) qui gouvernent l'entrée en végétation, (2) la sensibilité/tolérance aux principales maladies et/ou bioagresseurs (complété par l'étude de descendances obtenues à partir de croisements entre les quelques variétés très tolérantes et très sensibles que nous avons identifiées durant le projet), (3) les qualités du fruit :

organoleptiques, sensorielles, l'aptitude à la transformation et la conservation ou encore en lien avec la santé humaine et notamment l'étude des allergènes. Les nouveaux marqueurs identifiés viendront grossir la gamme d'outils à notre disposition pour mieux évaluer les variétés et apporter aux professionnels de la filière nucicole des éléments de nouvelles variétés et une connaissance plus approfondie de ces mêmes variétés.

Enfin, au-delà de l'image très scientifique et universitaire que renvoie ce projet, il revêt une importance capitale pour la filière nucicole. En effet, en raison du long cycle de vie des vergers de noyer, le choix variétal est déterminant vis-à-vis des bouleversements environnementaux et des nouvelles contraintes. Ce choix sera guidé par l'étude des ressources génétiques. De plus, même si elle affiche fièrement une place de second en termes de surface, le non-renouvellement de ce choix variétal dû à l'arrêt du programme d'amélioration et l'adaptabilité limitée des variétés étrangères sur notre territoire pourrait remettre en question la culture même du noyer, telle que nous la connaissons aujourd'hui, notamment avec ses labels qualités. ■

BIBLIOGRAPHIE

Bernard A, Lheureux F, Dirlwanger E. Walnut: past and future of genetic improvement. 2017. *Tree Genetics & Genomes* 14:1. DOI 10.1007/s11295-017-1214-0.

Bernard A., Barreneche T., Lheureux F., Dirlwanger E. Analysis of genetic diversity and structure in a worldwide walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using SSR markers. 2018a. *PLoS ONE* 13(11):e0208021.

Bernard A, Barreneche T, Lheureux F, Dirlwanger E. SSR genetic diversity assessment of the INRA's walnut (*Juglans* spp.) germplasm collection. XXX International Horticultural Congress (IHC 2018), Istanbul, Turkey, August 12-16, 2018b (Oral presentation).

Bernard A, Barreneche T, Delmas M, Durand S, Pommier C, Lheureux F, Tranchand E, Naudin M, Dirlwanger E. The walnut genetic resources of INRA : chronological phenotypic data and ontology. 2019. *BMC Research Notes* 12:662. DOI 10.1186/s13104-019-4678-1.

Bernard A., Marrano A., Donkpegan A., Brown P.J., Leslie C.A., Neale D.B., Lheureux F., Dirlwanger E. Association and linkage mapping to unravel genetic architecture of phenological traits and lateral bearing in Persian walnut (*Juglans regia* L.). 2020a. *BMC Genomics* 21:203.

Bernard A, Barreneche T, Donkpegan A, Lheureux F, Dirlwanger E. Management of a walnut germplasm collection: are SSR or SNP markers most suitable to preserve biodiversity? 2020b. *PLoS ONE* (in revision).

Bernard A, Hamdy S, Le Corre L, Dirlwanger E, Lheureux F. 3D characterization of walnut morphological traits using X-ray computed tomography. 2020c. *Plant Methods* (in revision).

Bernard A, Marrano A, Donkpegan A, Brown PJ, Leslie CA, Neale DB, Lheureux F, Dirlwanger E. Association and Linkage Mapping of Walnut (*Juglans regia* L.) Phenological Traits. International Plant & Animal Genome XXVIII, San Diego, CA, USA, January 11-15, 2020d (Oral presentation).

Lheureux F., Dirlwanger E., Bernard A. The French walnut improvement program. VIII international symposium on walnut, Cashew and Pecan (ISHS 2017), Santiago, Chile, Novembre 29 - December 1, 2017 (Oral presentation)

Lheureux F., Verhaeghe A., Bernard A., Dirlwanger E., Delmas M. Recherche et développement sur la noix - des projets pour un nouvel élan. 2018. *INFOS-CTIFL* n° 342 juin, p. 22-31.