



HAL
open science

SEEDQUAL : Caractérisation de la diversité génétique de la composition de la graine et du tourteau de colza pour des usages en alimentation animale

Sophie Rolland, Véronique Solé-Jamault

► To cite this version:

Sophie Rolland, Véronique Solé-Jamault. SEEDQUAL : Caractérisation de la diversité génétique de la composition de la graine et du tourteau de colza pour des usages en alimentation animale. Carrefour de la sélection colza, Jan 2022, en distanciel, France. hal-03652849

HAL Id: hal-03652849

<https://hal.inrae.fr/hal-03652849>

Submitted on 27 Apr 2022

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.

SEEDQUAL

Caractérisation de la diversité génétique de la composition de la graine et du tourteau de colza pour des usages en alimentation animale

IGEPP Rennes



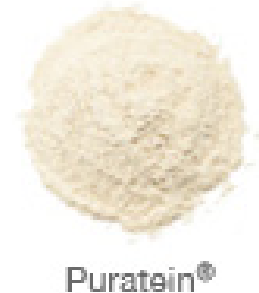
IJPB Versailles



BIA Nantes



PROMOSOL 2019-2022
Subvention: 183 k€



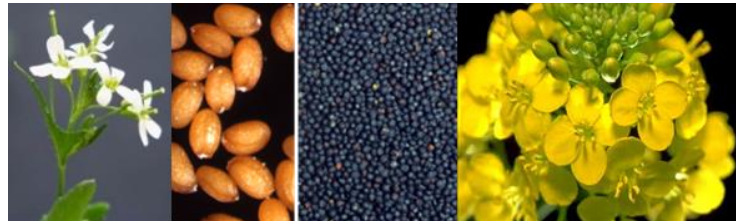
Actions de SEEDQUAL

Partie 1 : Qualité de la graine

- Déterminisme génétique et moléculaire de la qualité de la graine chez les Brassicacées (IGEPP, IJPB)
- Teneur en protéines totales et en fibres dans la graine (IGEPP, BIA, IJPB)

Partie 2 : Caractérisation de la composition en protéines de réserve des graines de colza

(IGEPP, BIA)



Qualité de la graine chez les Brassicacées

SEEDPROT

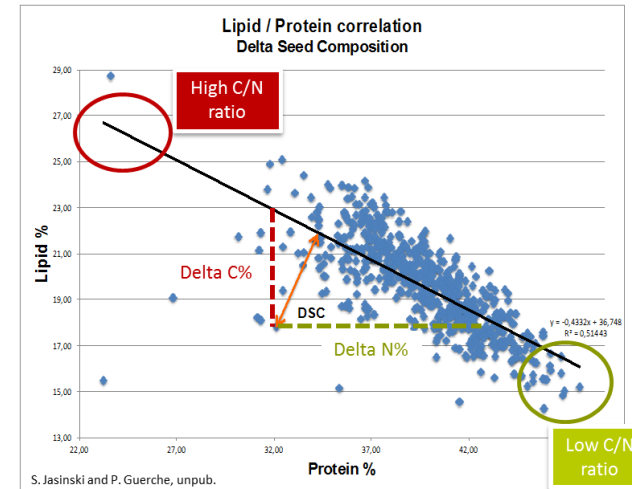
SEEDQUAL



- Teneur en huile (O) *
- Teneur en protéines (SP) *
- Teneur en glucosinolates (GSL) *



- DSC *, delta seed composition

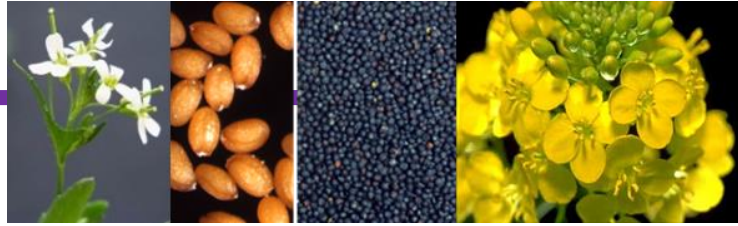


- Ratio O/SP (OSP) *
- $MPT^* = SP \times 100 / (100 - O)$
- $RES^* = 100 - (O + SP + WC)$

Sur extraits :

- Composition en protéines de réserve : protéines 2S et protéines 12S
- Teneur en oses totaux et composition osidique des PS
(cellulose, hémicelluloses & pectines)

Graines entières (*)



Partie 1 :

Architecture génétique de la qualité de la graine de colza

Architecture génétique de la qualité de la graine de colza



E. Corlouer



174 génotypes (30 ++, 15 0+, 1 +0, 128 00)

Génotypage 237k SNP

9 environnements (lieu × année)

18 essais (N+ / N-)

8 traits :

Teneur en huile (O - 1)

Teneur en protéines (SP - 57)

Ratio huile/protéines (OSP - 2)

Teneur en protéines du tourteau (MPT - 33)

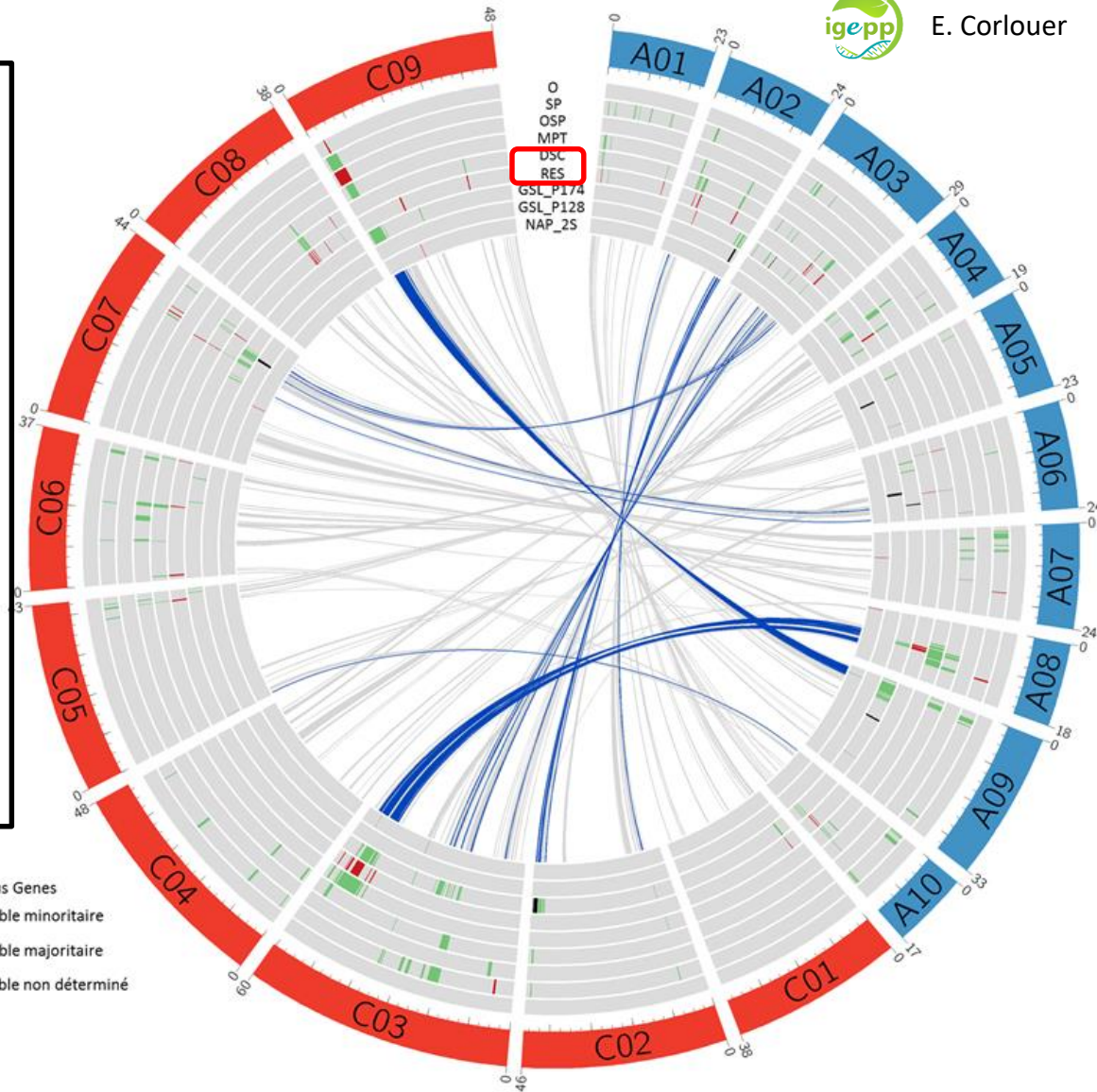
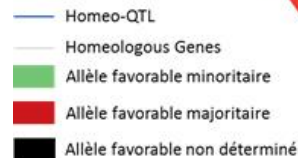
Delta Seed Composition (DSC - 45)

Teneur en résidus de la graine (RES - 39)

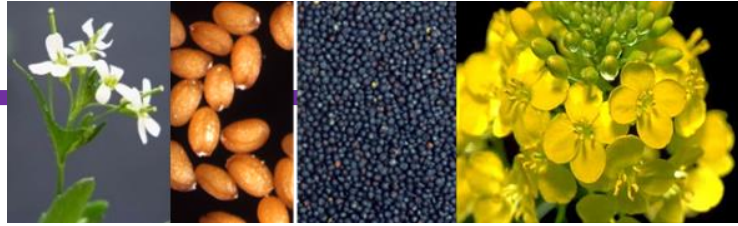
Teneur en glucosinolates (GSL - 69)

Teneur en napines (NAP_2S - 8)

-> 259 QTL



Nombreuses colocalisations (DSC/RES) : effets alléliques inversés

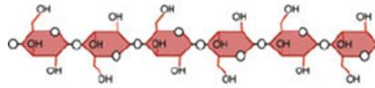


Détermination de la composition en fibres des graines

DSC et fibres

Polysaccharides pariétaux

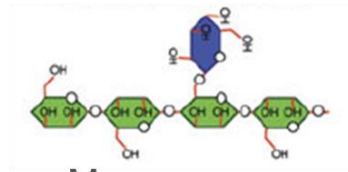
Cellulose



Cellulose microfibril

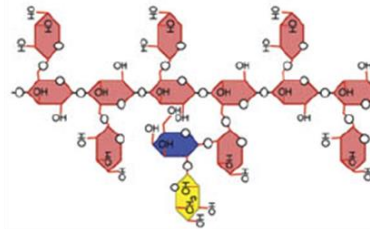


Hemicelluloses

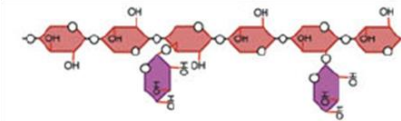


Mannanes

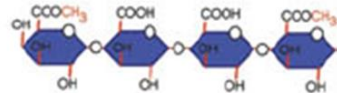
Glucanes



Xylanes

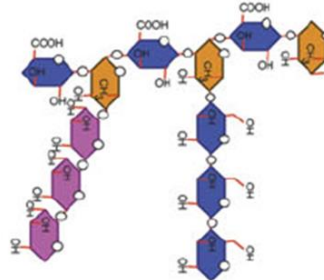


Pectines

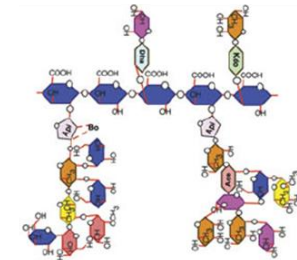


Homogalacturonanes

RG-I



RG-II

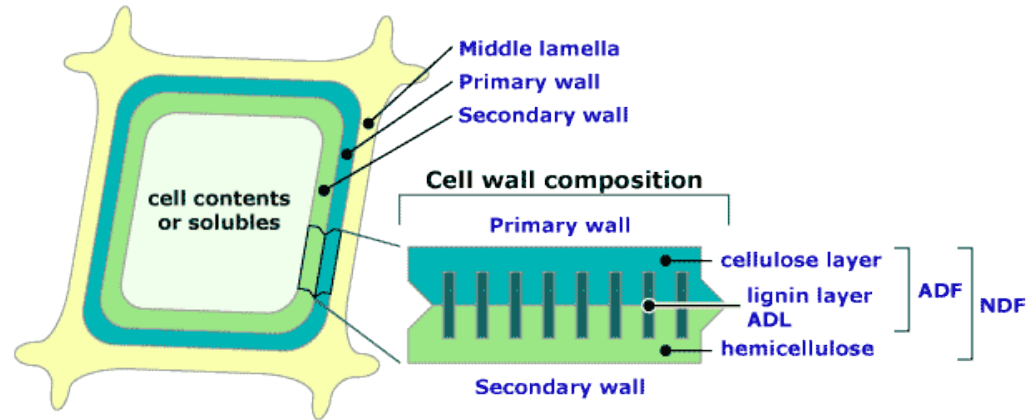


Sarkaret al. (2009) *J. Exp. Bot.* 60:3615-3635

- ⇒ Composition en polysaccharides pariétaux de la graine de colza (BIA, plateforme BIBS – Sophie Le Gall)
- ⇒ Recherche de marqueurs métaboliques du DSC
- ⇒ Modèles NIRS (IGEPP)

DSC et fibres:

pourquoi ne pas valoriser les équations ADL, ADF, NDF existantes?



Méthode NDF/ADF (Van Soest, 1965)

Initialement développée pour les fourrages (tiges lignifiées) dans le cadre de l'alimentation des ruminants

Dans les fourrages:

NDF=NSP (polysaccharides pariétaux)

ADF = cellulose + lignines

Quid substrats hors fourrages? (ex blé : la majorité des pectines et des AX et beta-glucanes hydrosolubles sont éliminés)

Dosage des polysaccharides pariétaux

Protocole de dosage des polysaccharides pariétaux

Graines → 92 accessions

↓ *Broyage couteaux*

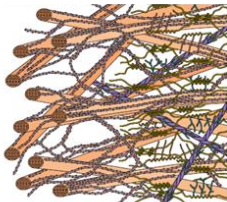
Farine

↓ *Délipidation*

Tourteaux

↓ *Extraction des PS*

« Résidus »



Résidus insolubles à l'éthanol #
Polysaccharides

Automatisation des extractions



Analyse des oses constitutifs des polysaccharides par chromatographie en phase gazeuse (CpG) après hydrolyse acide

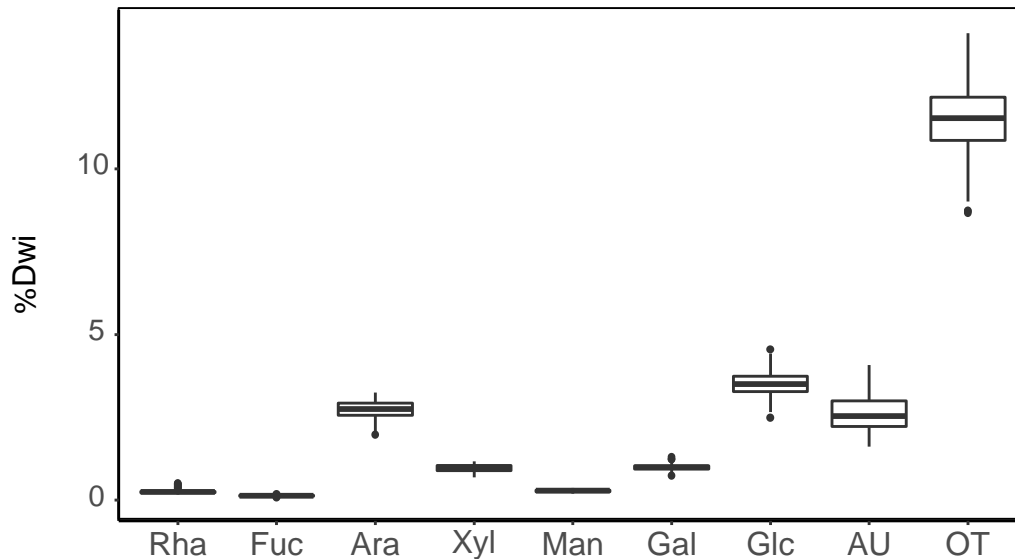
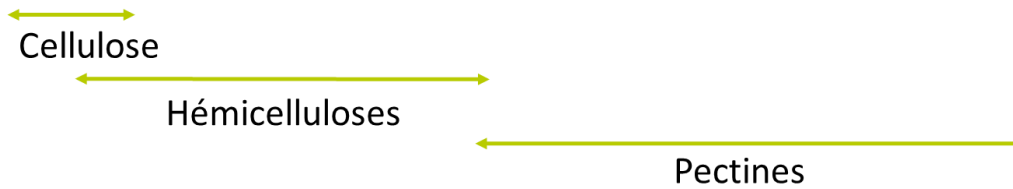
Informations sur teneurs (individuelle ou totale) & composition des fibres



Recherche de marqueurs pour le DSC (*Brassica napus*)

■ Variabilité de l'arabinose et du glucose chez le colza

PS totaux (%Dwi)	Glc	Fuc	Man	Xyl	Rha	Gal	Ara	AU	OT
mediane	3,50	0,13	0,28	0,99	0,24	0,99	2,74	2,54	11,52
ecartype	0,36	0,02	0,03	0,11	0,07	0,10	0,27	0,51	1,12

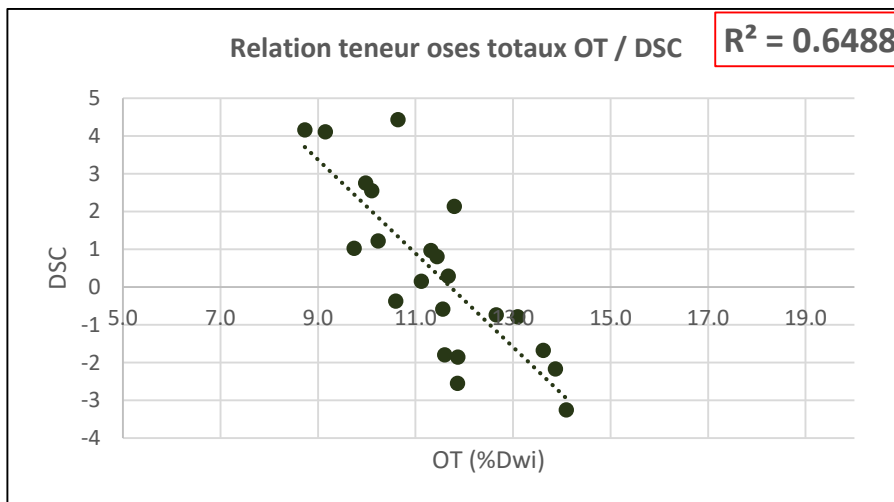
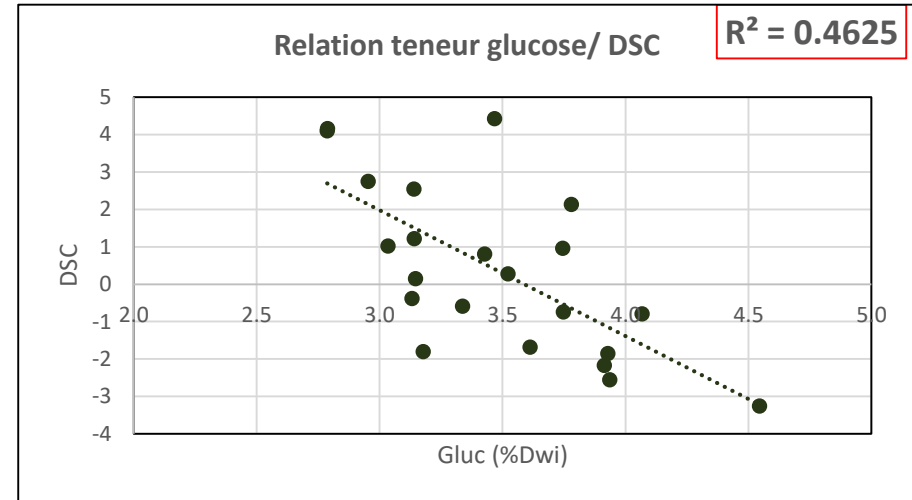
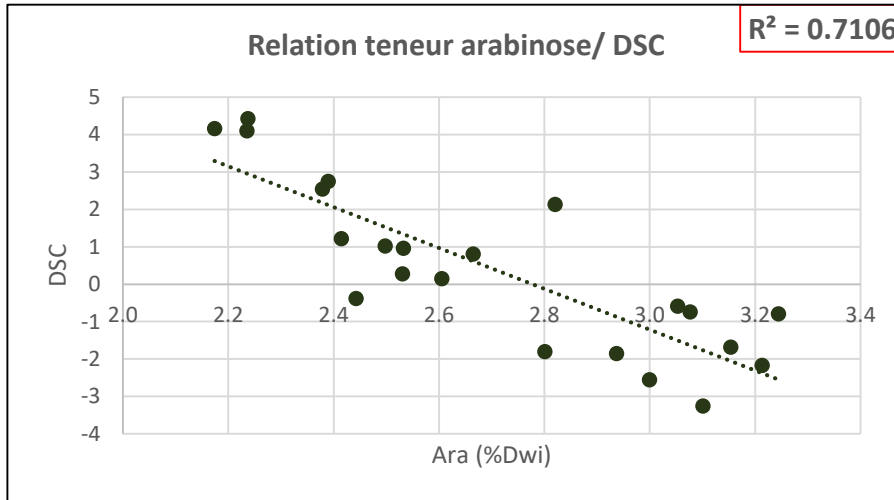


Faible variabilité : Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal

Variabilité + importante : Ara, Glc

Recherche de marqueurs pour le DSC (*Brassica napus*)

- Sélection de 20/92 variétés faibles ou forts DSC sur 18 essais du réseau Rapsodyn



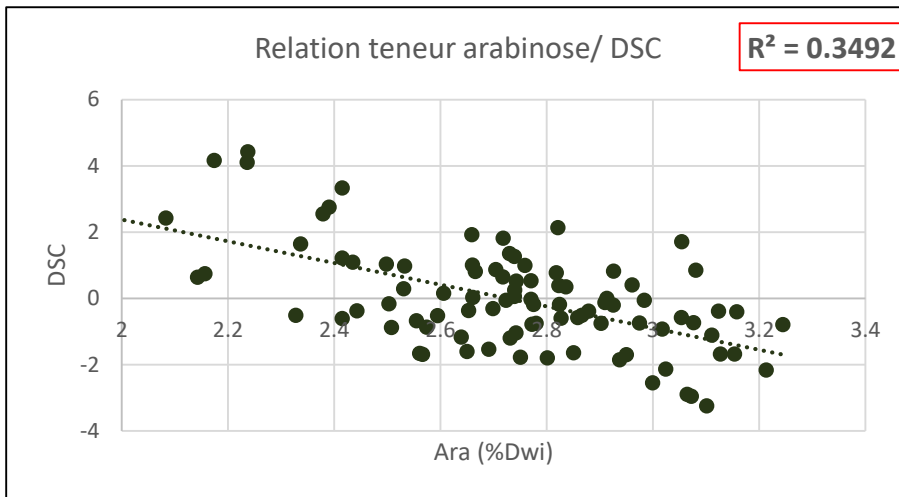
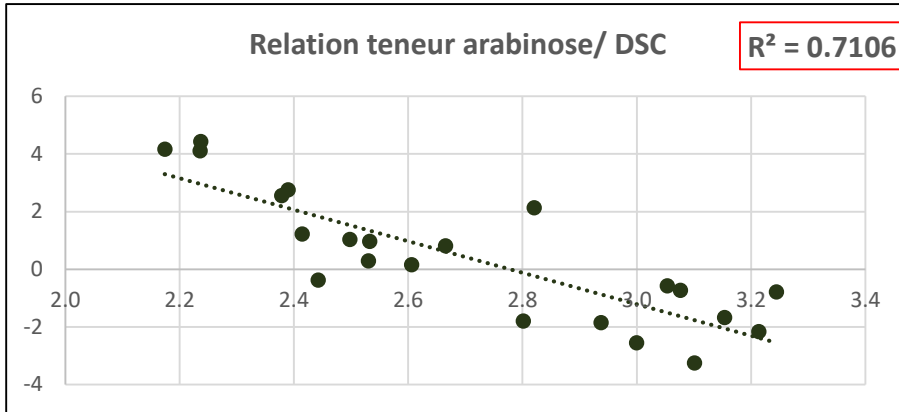
Bonne corrélation DSC / arabinose



Est-ce que l'arabinose est un bon marqueur pour le DSC ?

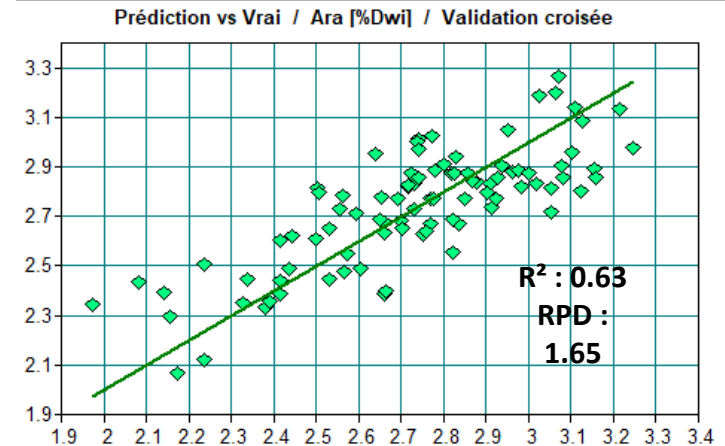
Recherche de marqueurs pour le DSC (*Brassica napus*)

Relation entre DSC et oses sur l'ensemble du panel SEEDQUAL (92 accessions)



Développement d'une calibration NIRS

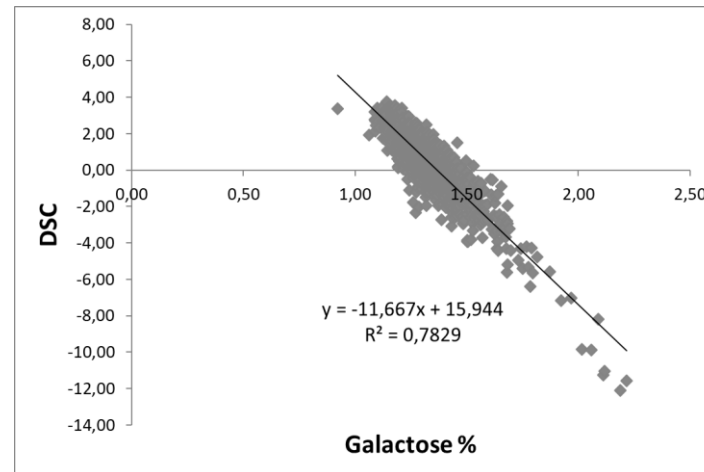
= augmenter les capacités de phénotypage pour augmenter nombre de données réinjecter dans les corrélations DSC / Ara



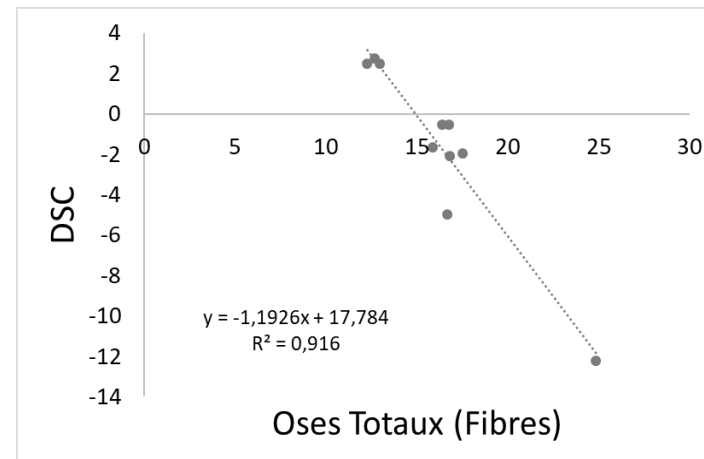
Sur les 92 accessions, corrélation DSC / Ara plus faible...

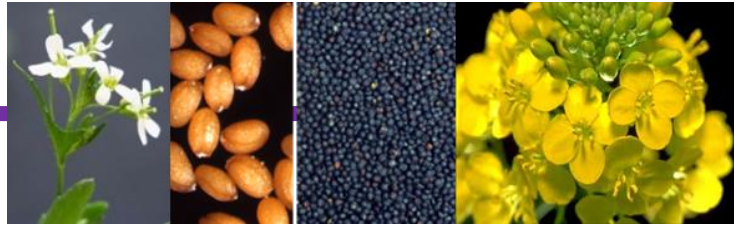
Recherche de marqueurs pour le DSC (*Arabidopsis thaliana*)

**Corrélation DSC / Galactose
(modèle NIRS)**



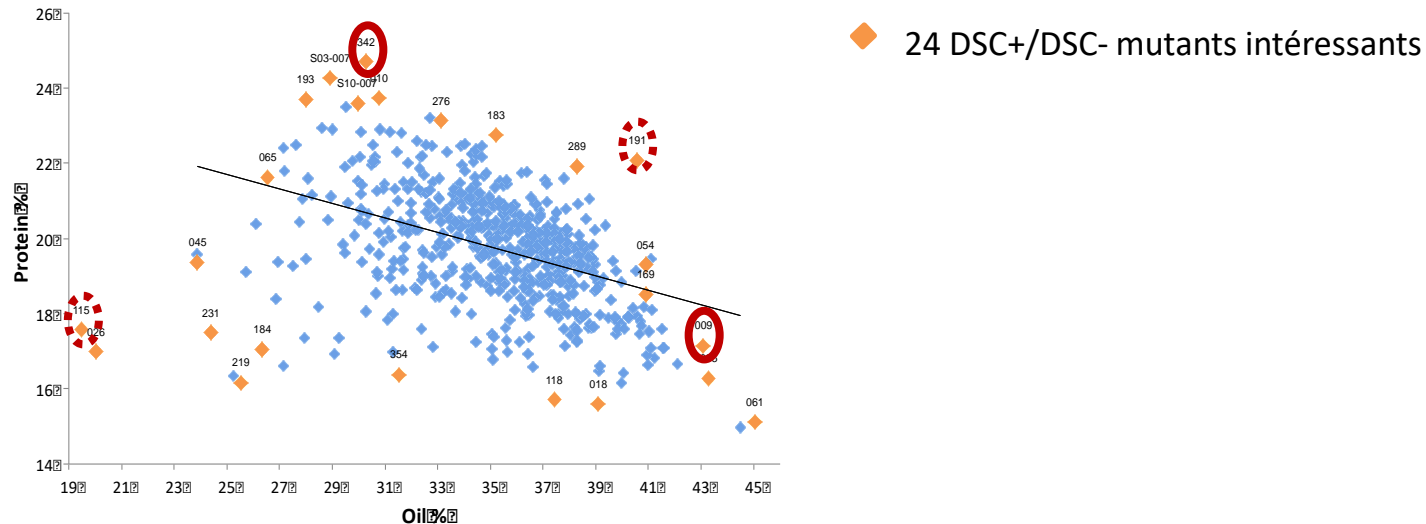
**Corrélation DSC / oses totaux
(HPLC)**





**Comprendre les mécanismes moléculaires
conduisant au phénotype DSC+/- :
identification de mutants affectés pour le DSC
et cartographie par séquençage des gènes responsables chez *Ath***

Phénotypage d'une population de mutants homozygotes :



Identification des gènes causaux:

- > Production de populations F2 Col-0 x mutant
- > Phénotypage des graines de 200 F2 : $\frac{1}{4}$ [mutant], $\frac{1}{2}$ [hz], $\frac{1}{4}$ [wt]
- > 30 plantes mutantes pour séquençage et analyse en bulk -> identification des mutations causales
- > Analyse fonctionnelle des gènes pour identifier le meilleur candidat

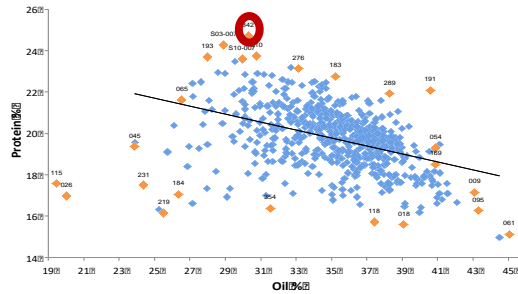
Démarche réalisée sur 4 mutants cibles 0

Caractérisation moléculaire de mutants DSC chez *Arabidopsis thaliana*

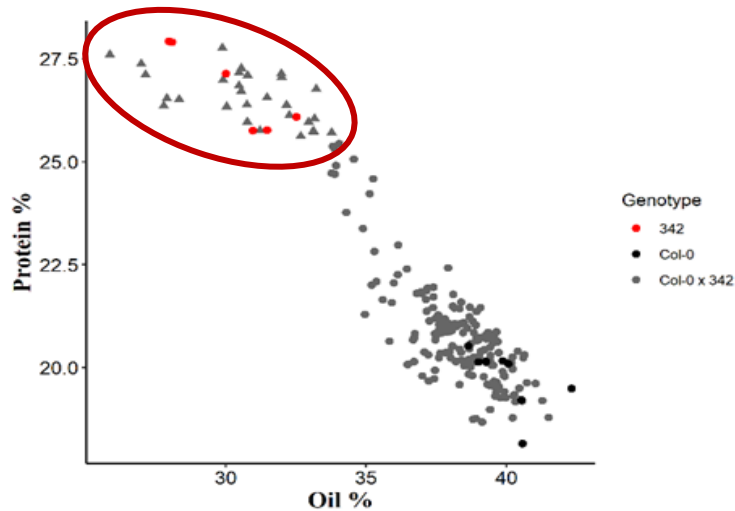


S. Jasinski
P. Guerche

➤ Mutant 342



Col x 342



3 gènes candidats

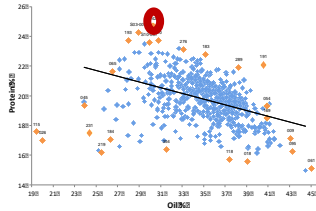
Gene	Description	Change	Mutation effect	Mutant lines
At5g63490	CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domains-containing protein	G > A	non-synonymous	SALKseq_068170 (N568170)
At5g63980	ALTERED EXPRESSION OF APX2 8 (ALX8), FIERY1 (ATFRY1), ROTUNDA 1 (RON1), SAL1...	G > A	Splice change	fry1-4, fry1-6 (from H. Vaucheret)
At5g65220	PRPL29 (Plastid Ribosomal Proteins of the 50S subunit 29): Ribosomal L29 family protein	G > A	non-synonymous	SALK_037831 (N537831)

Caractérisation moléculaire de mutants DSC chez *Arabidopsis thaliana*

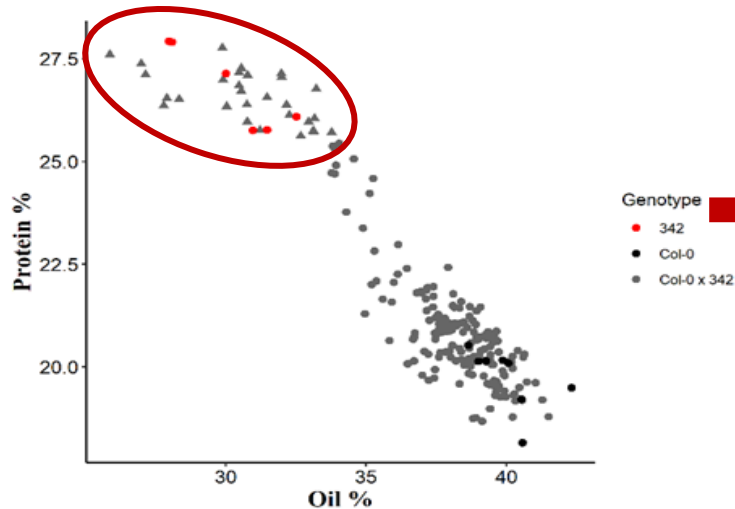


S. Jasinski
P. Guerche

➤ Mutant 342



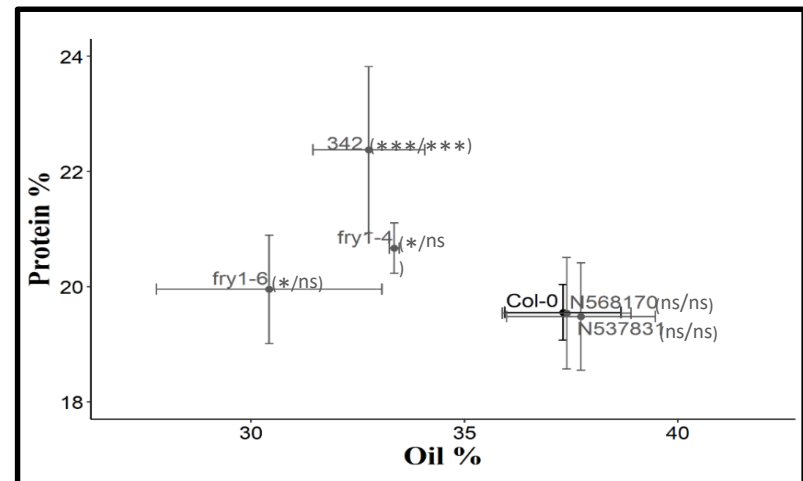
Col x 342



3 gènes candidats

Gene	Description	Change	Mutation effect	Mutant lines
At5g63490	CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domains-containing protein	G > A	non-synonymous	SALKseq_068170 (N568170)
At5g63980	ALTERED EXPRESSION OF APX2 8 (ALX8), FIERY1 (ATFRY1), ROTUNDA 1 (RON1), SAL1...	G > A	Splice change	fry1-4, fry1-6 (from H. Vaucheret)
At5g65220	PRPL29 (Plastid Ribosomal Proteins of the 50S subunit 29): Ribosomal L29 family protein	G > A	non-synonymous	SALK_037831 (N537831)

La mutation dans le gène *FRY1* semble être responsable du phénotype du mutant 342 : Confirmation du gène candidat *FRY1* (tests d'allélisme, complémentation phénotypique)

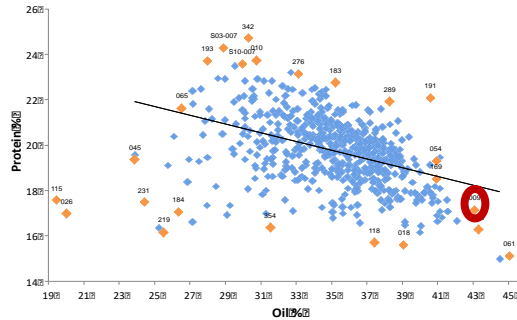


Caractérisation moléculaire de mutants DSC chez *Arabidopsis thaliana*

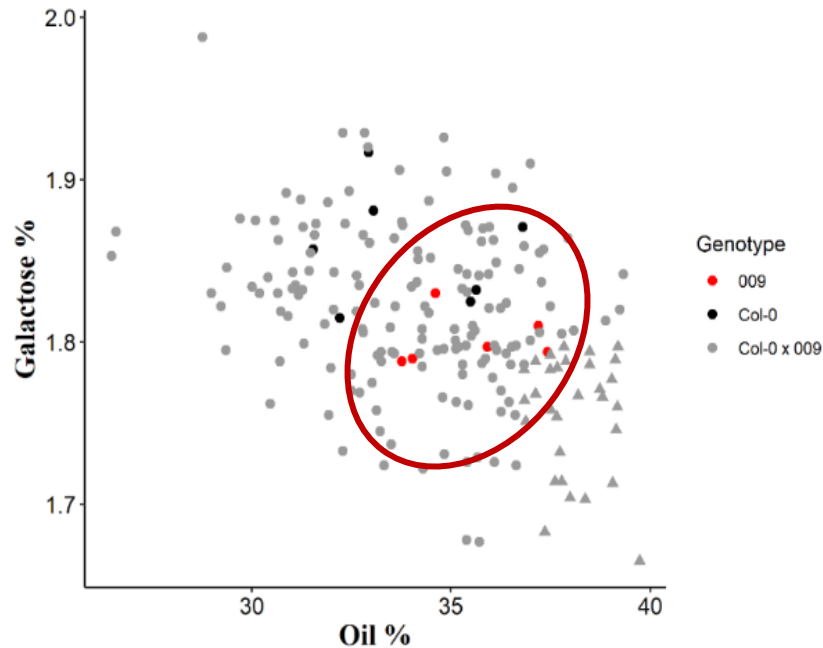


S. Jasinski
P. Guerche

➤ Mutant 009



Col x 009



Le phénotype du mutant 009 est trop proche de celui de Col-0 : erreurs de phénotypage
Impossibilité de déterminer par séquençage la zone génomique impliquée ...

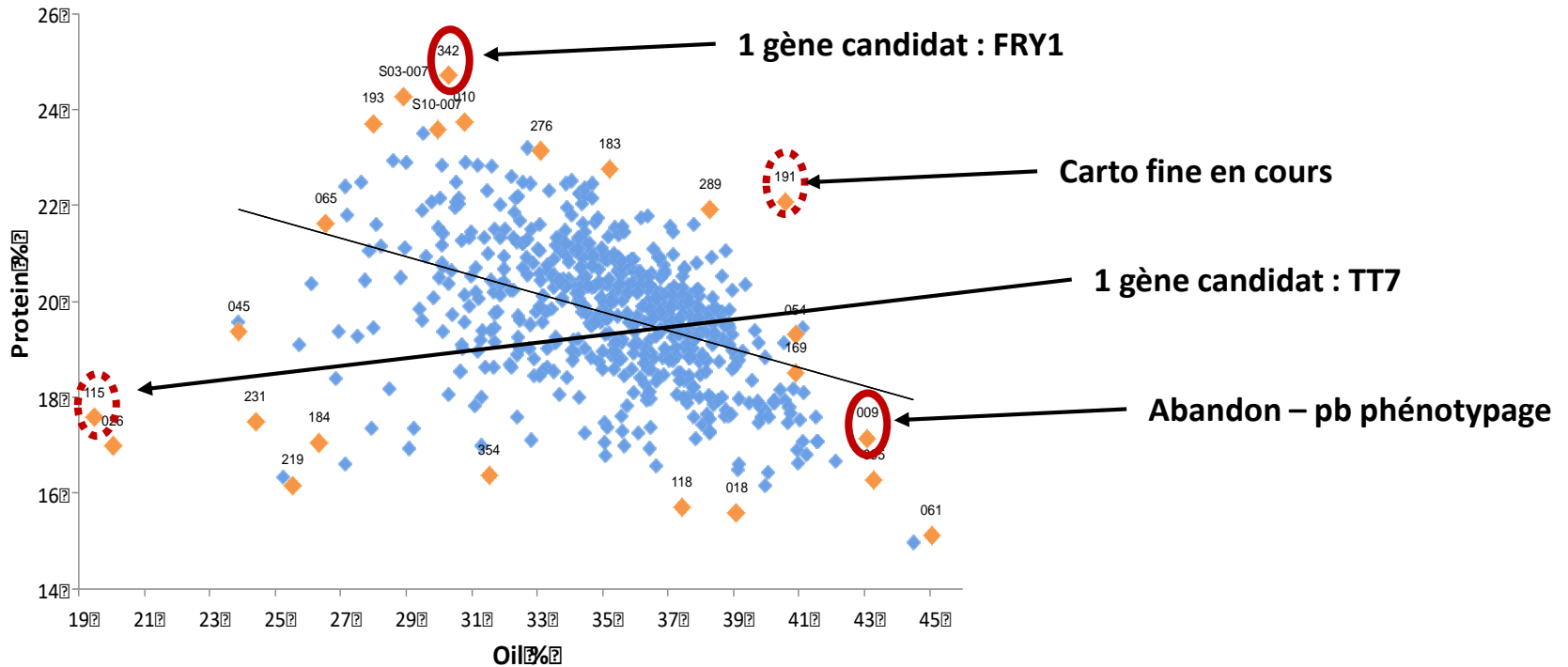
-> Pas de gène candidat

Caractérisation moléculaire de mutants DSC chez *Arabidopsis thaliana*



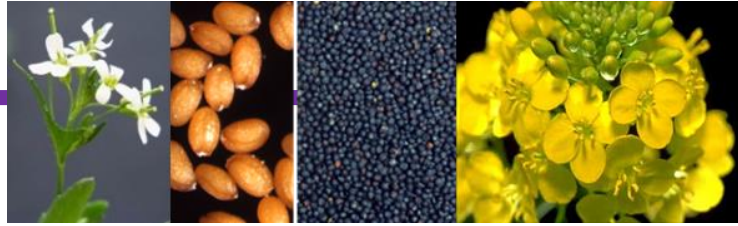
S. Jasinski
P. Guerche

Conclusions et perspectives :



Prochaine étape : validation fonctionnelle des gènes candidats chez *Arabidopsis*

... puis : aller chercher les gènes orthologues chez colza



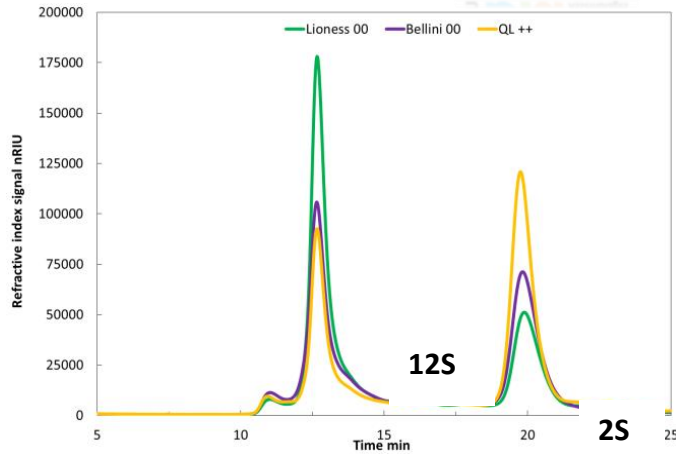
Partie 2 :

Compréhension du lien entre composition en protéines de réserve et d'autres variables de la graine de colza (glucosinolates)

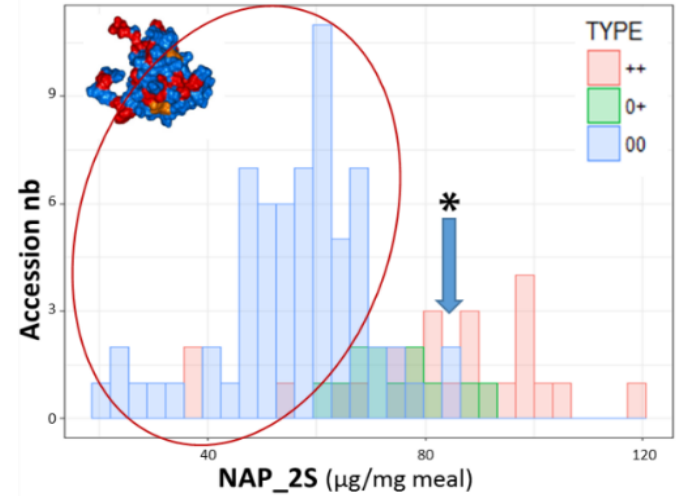
La sélection du colza pour la qualité de la graine a modifié la balance 2S/12S des protéines de réserve de la graine (SSP)

Quantification de SSP

UR 1268 **bia** Biopolymères Interactions Assemblages



Distribution des 2S dans la graine

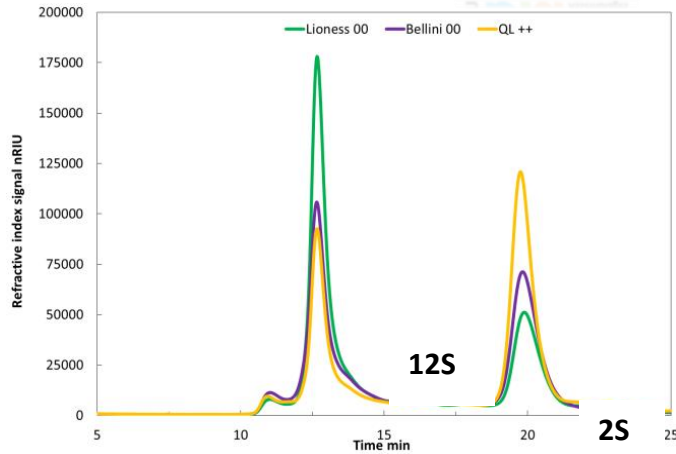


E. Corlouer

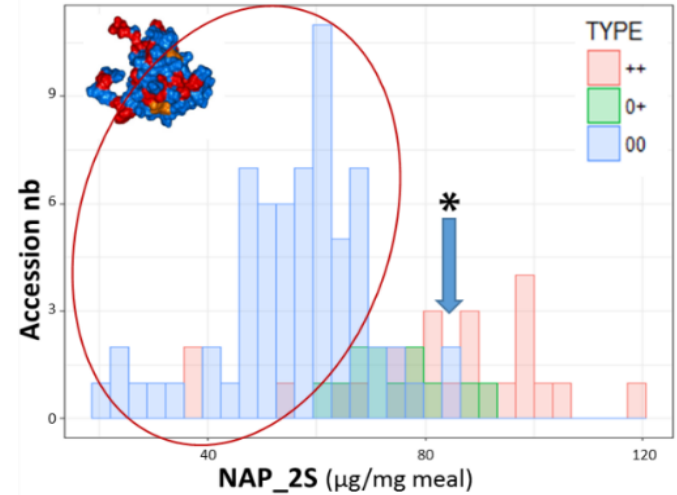
La sélection du colza pour la qualité de la graine a modifié la balance 2S/12S des protéines de réserve de la graine (SSP)

Quantification de SSP

UR 1268 **bia** Biopolymères Interactions Assemblages



Distribution des 2S dans la graine



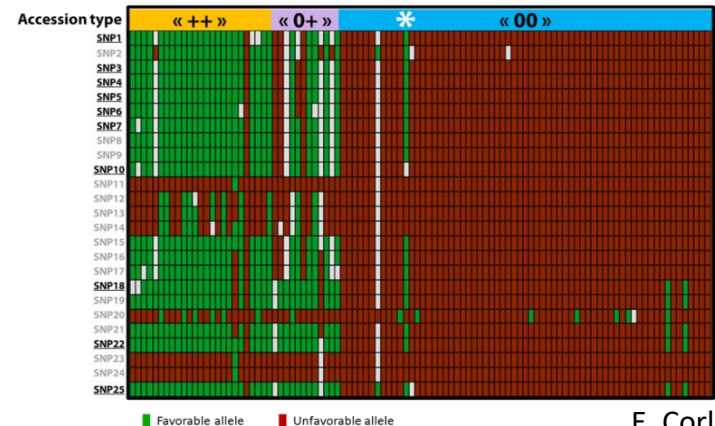
Allelic distribution in WOSR (A09-1_2S QTL)

GWAS results (Dbzh_V10)

	% 2S	
A09	2 373 984	3 087 788
	3 704 528	3 758 820
	4 003 561	4 387 642
C02	44 890 771	45 059 324
C06	30 316 085	-
C07	35 236 211	35 375 028
C09	816 997	872 443
	1 315 791	3 599 120

QTL GSL (pop174)

allèle mino favorable

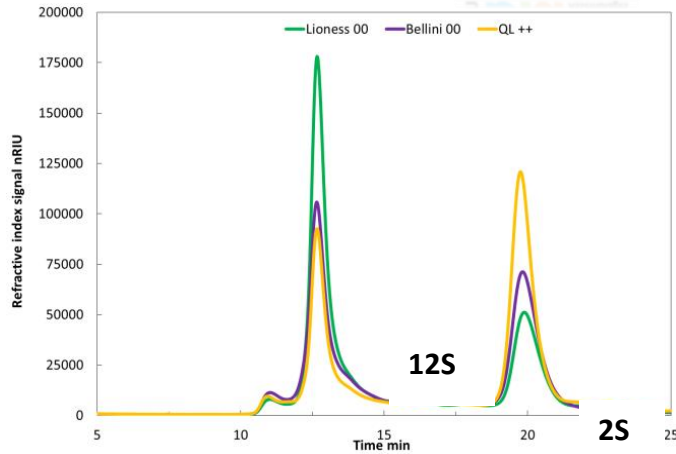


E. Corlouer

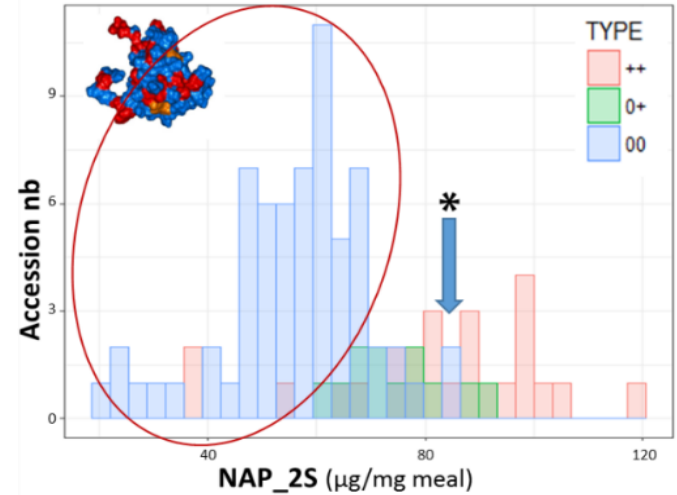
La sélection du colza pour la qualité de la graine a modifié la balance 2S/12S des protéines de réserve de la graine (SSP)

Quantification de SSP

UR 1268 **bia** Biopolymères Interactions Assemblages



Distribution des 2S dans la graine

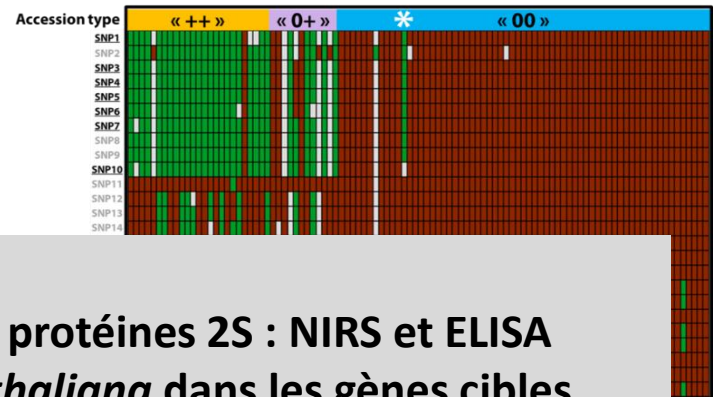


Allelic distribution in WOSR (A09-1_2S QTL)

GWAS results (Dbzh_V10)

	% 2S	
A09	2 373 984	3 087 788
	3 704 528	3 758 820
	4 003 561	4 387 642
C02	44 890 771	45 059 324
C06	30 316 085	-
C07		
C09		

QTL GSL (pop174)



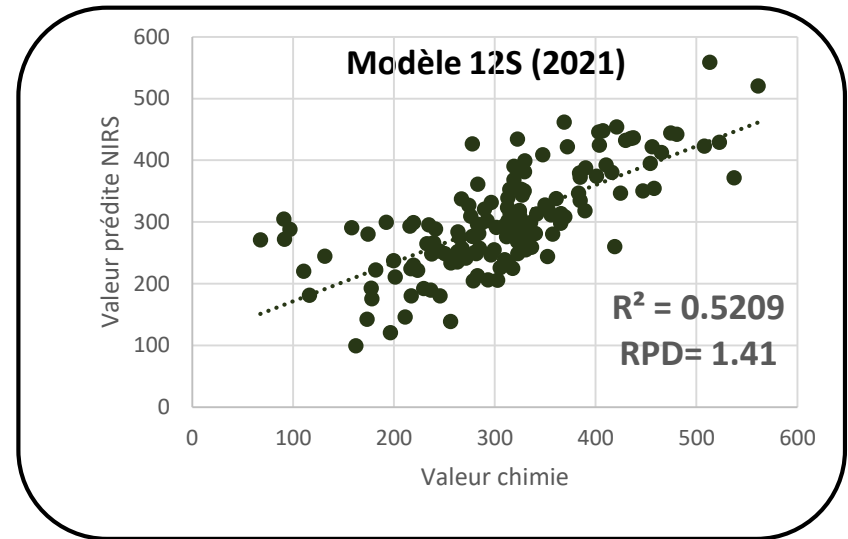
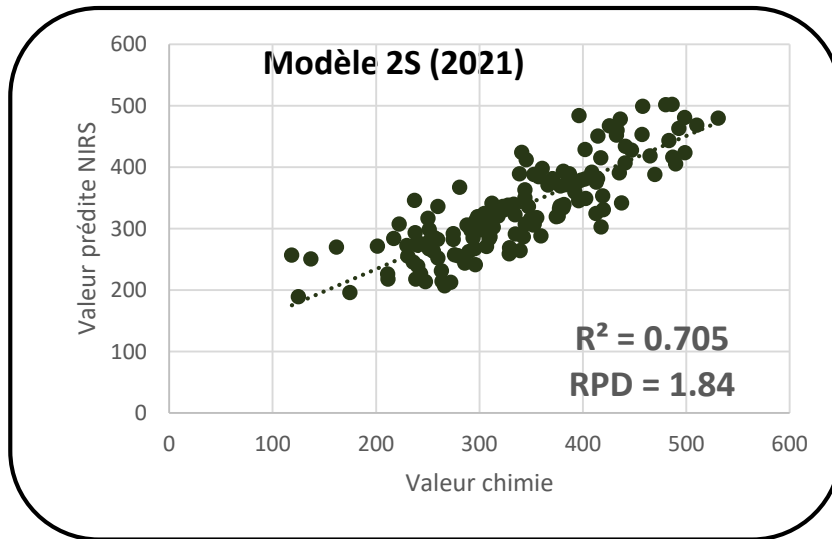
Autres ressources ?

- Méthodes d'évaluation haut-débit des protéines 2S : NIRS et ELISA
- Lien gluco / 2S : Mutants *Arabidopsis thaliana* dans les gènes cibles

Calibrations NIRS pour prédire les teneurs en 2S/12S

- Modèle 2017 : 101 spectres NIRS + données chimie correspondantes (SEEDPROT)
- Modèle 2021 : données 2017 + 69 spectres NIRS + données chimie correspondantes (SEEDQUAL)

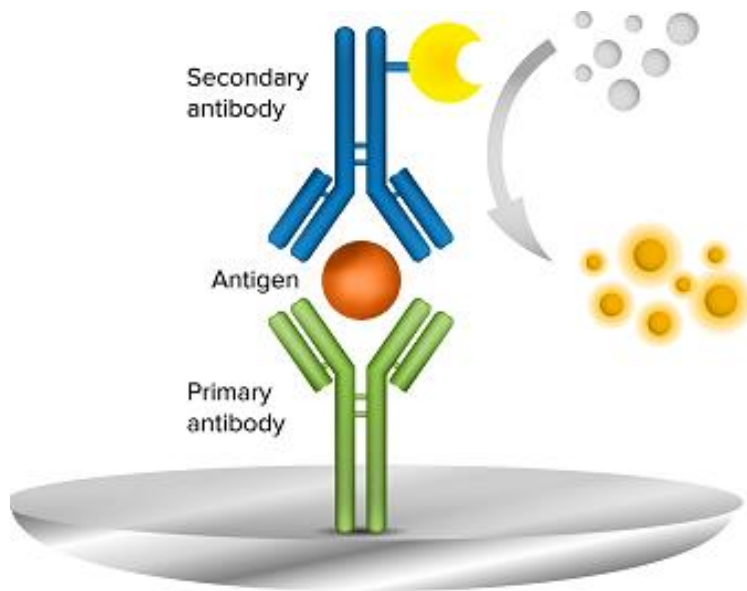
↪ Amélioration des performances des modèles



- Transfert des calibrations NIRS aux partenaires privés Promosol
- Nécessité d'augmenter le nombre d'échantillons du modèle
 - ↪ développement de méthodes de phénotypage haut débit: ELISA

ELISA quantitatif

- Principe du dosage ELISA et son développement



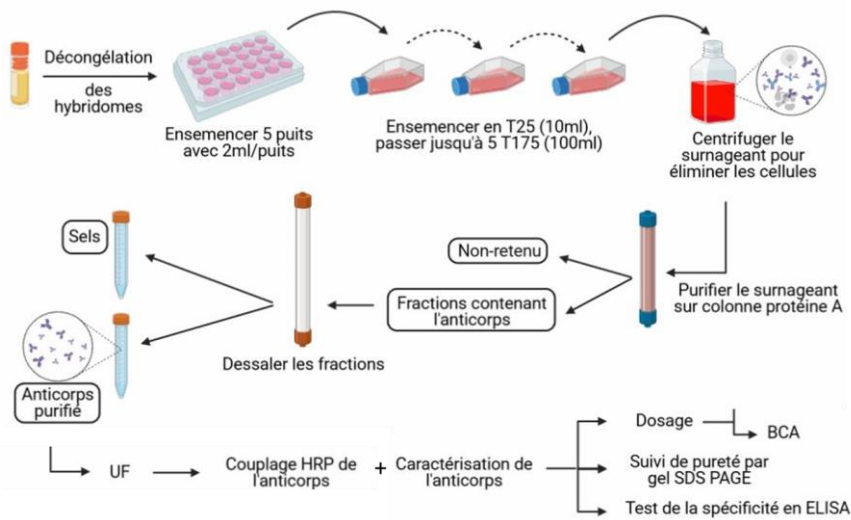
Source : proteogenix, molecular device



mAb &
pAb generation

ELISA quantitatif

- Production, purification et caractérisation des clones d'anticorps



Projet Pronap



36 Clones 12S

22 clones 2S



6 Clones 12S

5 Clones 2S

Quantité > 3 mg

Quantité > 4 mg

Pureté >80%

Pureté >95%

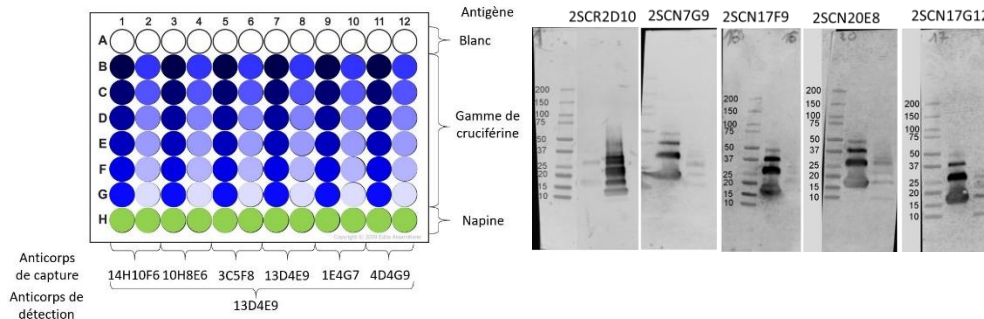


Protocol
development

ELISA quantitatif

- Criblage des paires d'anticorps : 12S 36 conditions, 2S 25 conditions

Critères : Valeur des blancs, Valeur de napine / cruciférine, Gamme de détection, Profil en western blot



- Sélection :

↪ 12S: Capture : 3C5F8 / Détection : 10H8E6

↪ 2S: Capture : 2SCN20E8 / Détection : 2SCN17G12

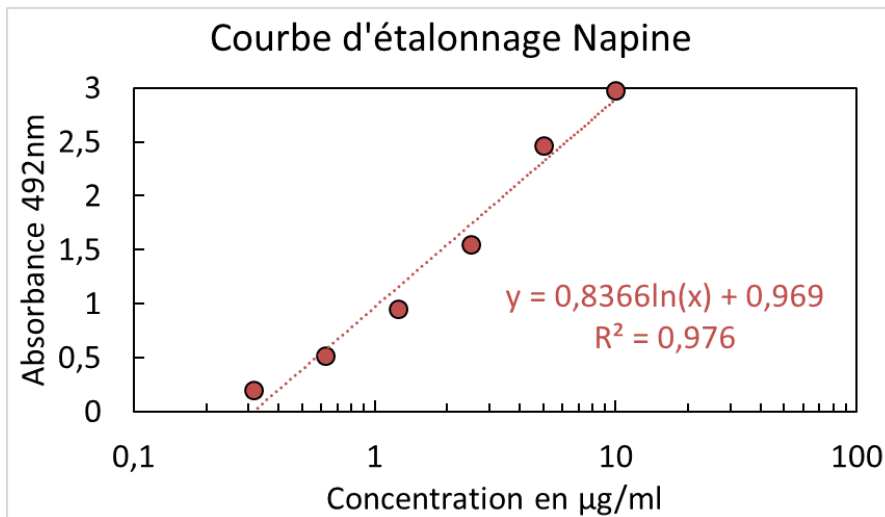
- Optimisation: solution de saturation; concentration des anticorps de capture et détection



Assay
validation

ELISA quantitatif


- ELISA 12S: problème de répétabilité de la gamme d'étalonnage
- ELISA 2S: validation sur le panel seedqual en cours , criblage de 10 variétés par plaque 96 puits



	Gamme 2S		Var1	Var2	Var3	Var4	Var5	Var6	Var7	Var8	Var9	Var10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,28	0,31	1,59	3,79	2,24	3,87	3,67	3,6	1,54	3,56	3,39	1,58
B	3,22	3,32	1,92	3,25	1,51	3,39	3,2	3,07	1,09	3,1	2,94	1,06
C	2,62	2,89	0,87	2,25	1,13	2,45	2,38	1,98	0,7	2,36	1,88	0,68
D	1,9	1,8	0,66	1,44	0,83	1,54	1,65	1,26	0,56	1,65	1,24	0,49
E	1,13	1,37	1,73	2,77	1,43	3,23	2,09	2,74	1,42	1,54	2,63	1,78
F	0,9	0,74	1,26	2	1,06	2,38	1,4	1,87	1,23	1,16	1,88	1,39
G	0,5	0,49	1,41	1,4	0,73	1,43	1	1,19	0,79	0,74	1,14	0,84
H	0,41	0,32	0,51	0,82	0,43	0,89	0,56	0,76	0,52	0,49	0,71	0,51

Gènes sous QTL 2S-GSL : lien avec le métabolisme soufré

Chromosome	Gènes sous QTL	% 2S	
A09 - 1	MYB34 (voie du tryptophane, auxine et gluco) GTR2 (glucosinolate transporter)	A09	2 373 984 3 087 788
			3 704 528 3 758 820
			4 003 561 4 387 642
		C02	44 890 771 45 059 324
		C06	30 316 085 -
A09 - 2	-	C07	35 236 211 35 375 028
A09 - 3	APK APS kinase (voie des glucosinolates)	C09	816 997 872 443
C02	GTR 2		1 315 791 3 599 120
C06 / C07	-		
C09 - 1	-		
C09 - 2	MYB34 GTR2 MYB28 (mis en évidence dans étude des gluco des feuilles) GSH2 glutathione synthetase 2 ATSDI1 (Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein) – réponse aux carences en soufre IAA28 indole-3-acetic acid inducible 28 (cellular element controlling the integration of sulphur- and auxin-related pathways)		



= 7 gènes différents identifiés
-> orthologues *Arabidopsis thaliana*

Gènes orthologues *Arabidopsis thaliana* : mutants d'insertion (SALK Institute)

- Sélection des lignées avec des mutations sur les **séquences codantes**, en privilégiant des mutants affectés sur un gène unique.
 - 1 à 3 lignées en fonction du gène cible -> **12 mutants au total**

Gène	Arabido	Mutants
MYB34	At5g60890	SALK_006901C SALK_053527c SALK_099636
GTR2	AT5G62680	SALK_052178C
MYB28	AT5G61420	SALK_136312C
ATSDI1	AT5G48850	SALK_099766C SALK_145035C
GSH2	AT5G27380	SALK_129012.1 SALK_209419C SALKseq_106652
APK APS kinase	AT2G14750	SALK_036887C
IAA28	AT5G25890	SALK_129988C

Phénotypage des lignées :

NIRS pour huile/prot/GSL (IJPB – Sophie Jasinski)

CNS par combustion Dumas (sur graines entières - IGEPP)

ELISA / HPLC pour SSP (BIA - Véronique Solé)

 Identifier le(s) gène(s) responsables du phénotype observé

Perspectives sur le projet SEEDQUAL (14 mois, jusqu'en Mars 2023)

● **Partie 1 : Qualité de la graine de colza**

-> Terminer **l'identification et la caractérisation fonctionnelle** des loci DSC+/DSC- chez *Arabidopsis*.

Pour les gènes les plus prometteurs :

- identifier les orthologues chez le colza
- investiguer leur éventuelle colocalisation avec des QTL de DSC

-> **Utiliser nos capacités prédictives** (NIRS) pour estimer les teneurs en certains oses pariétaux (fibres) sur un plus grand nombre de géotypes contrastés pour le DSC

● **Partie 2 : Caractérisation de la composition en protéines de réserve des graines de colza**

Comprendre le lien entre la teneur en napines (2S) et en glucosinolates de la graine de colza, via l'analyse des mutants d'*Arabidopsis thaliana*

Rédaction d'un papier dans OCL (à préciser)

Remerciements



- **Partenaires 'directs' du projet**



Nadège Le Garrec, Erwan Corlouer, Sophie Rolland, Cécile Baron, Anne Laperche, Nathalie Nesi



Sophie Jasinski, Philippe Guerche, Alain Lécureuil



Lucie Le Bot, Véronique Solé-Jamault, Sophie Le Gall

- **Collègues Brassica de l'IGEPP**

- **Le CoPil SEEDQUAL**

Françoise Labalette, Philippe Fouillard, Jean-Claude Pruvost, Pauline Bansept-Basler, Clara Simon, Thomas Foubert et Marie Boillot