



HAL
open science

SEEDQUAL : Caractérisation de la diversité génétique de la composition de la graine 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 de colza pour des usages en alimentation animale. Carrefour de la sélection Colza, Promosol, Jan 2023, Bruz (FR), France. hal-03964393

HAL Id: hal-03964393

<https://hal.inrae.fr/hal-03964393v1>

Submitted on 31 Jan 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.

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



SEEDPROT

PROMOSOL 2019-2022

Subvention: 183 k€



l'institut Agro
agriculture • alimentation • environnement



Puratein®

Actions de SEEDQUAL

Partie 1 : Qualité de la graine

- Déterminisme génétique et moléculaire de la qualité de la graine chez les Brassicacées  
- Teneur en protéines totales et en polysaccharides pariétaux (*#fibres*) dans la graine 

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

- Rendement d'extraction des protéines dans la collection 
- Compréhension du lien entre composition en protéines de réserve et d'autres variables de la graine de colza (glucosinolates)   

Qualité de la graine chez les Brassicacées

SEEDPROT

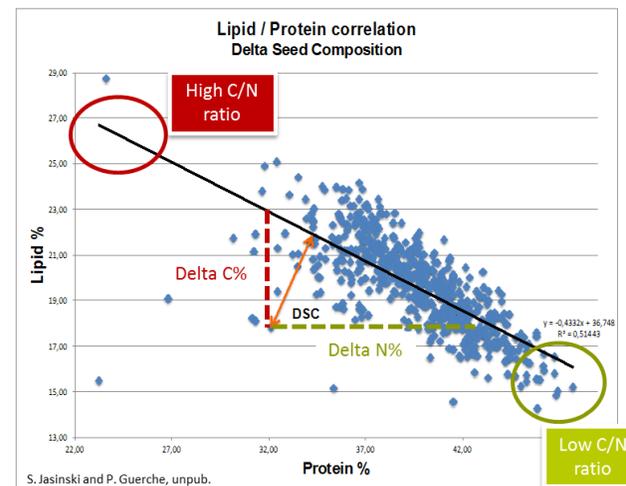
SEEDQUAL



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



- DSC *, delta seed composition

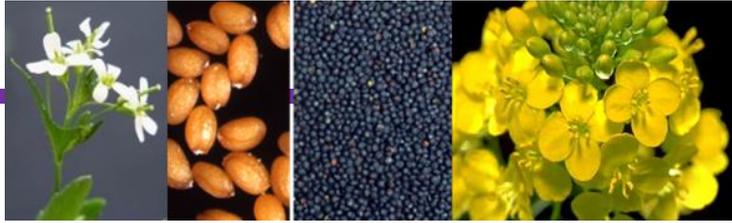


- Ratio O/SP (OSP) *
- MPT * = $SP \times 100 / (100 - O)$
- RES * = $100 - (O + SP + WC)$

Sur extraits :

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

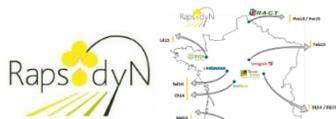
Graines entières (*)



Partie 1 :

Architecture génétique de la qualité de la graine de colza

Architecture génétique de la qualité de la graine de colza



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

Génotypage 237k SNP

9 environnements (lieu x 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)

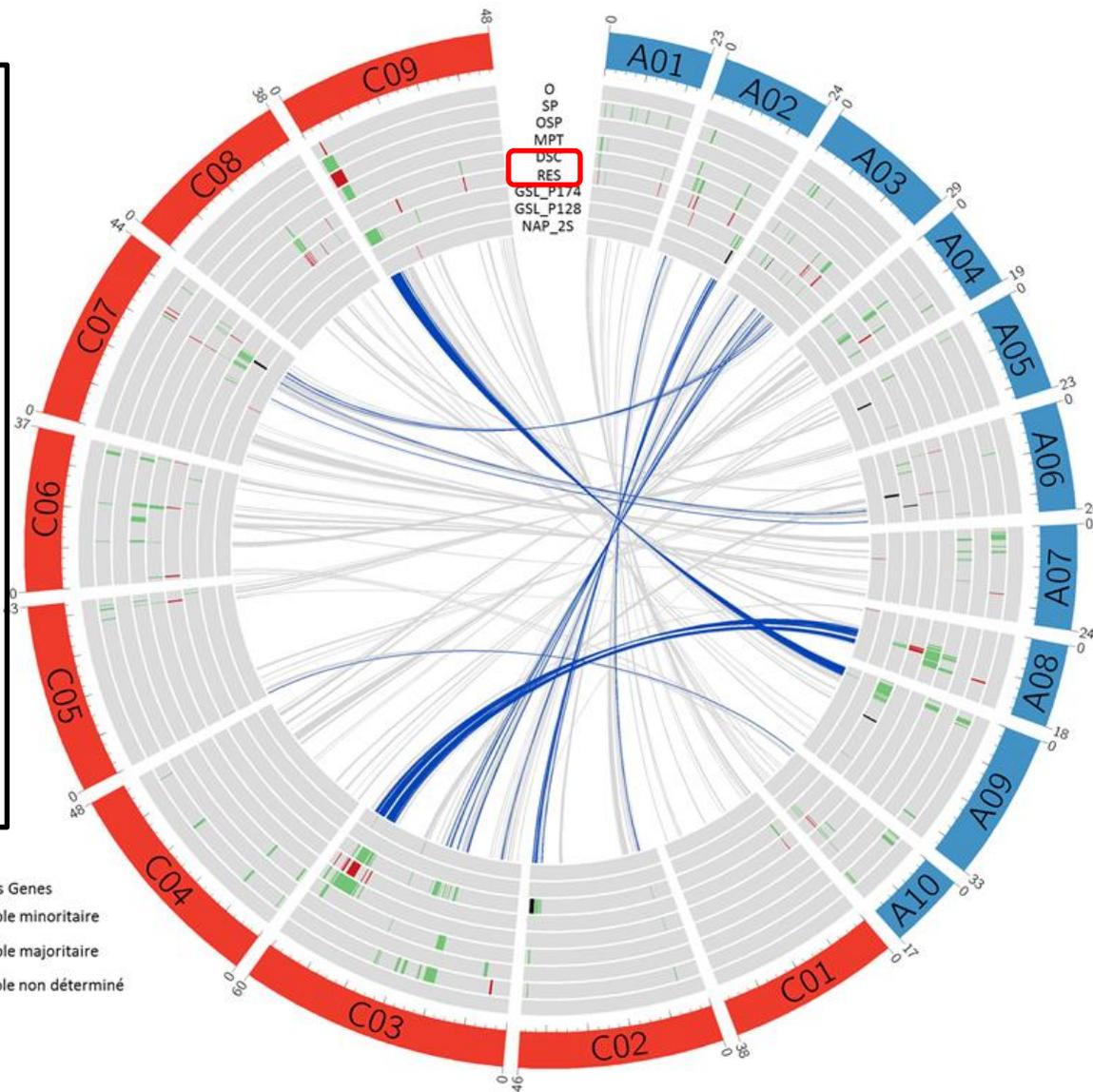
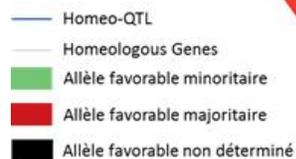
Delta Seed Composition (DSC - 45)

Teneur en résidus de la graine (RES - 39)

Teneur en glucosinolates (GSL - 69)

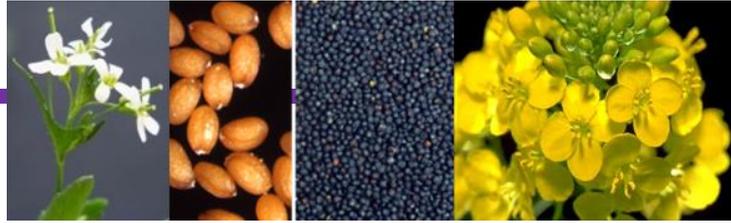
Teneur en napines (NAP_2S - 8)

-> 259 QTL



Nombreuses colocalisations (DSC/RES) : effets alléliques inversés

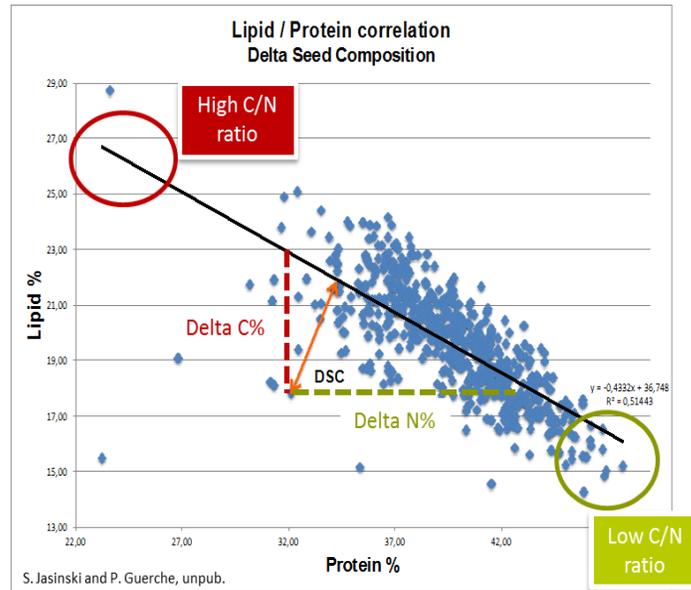




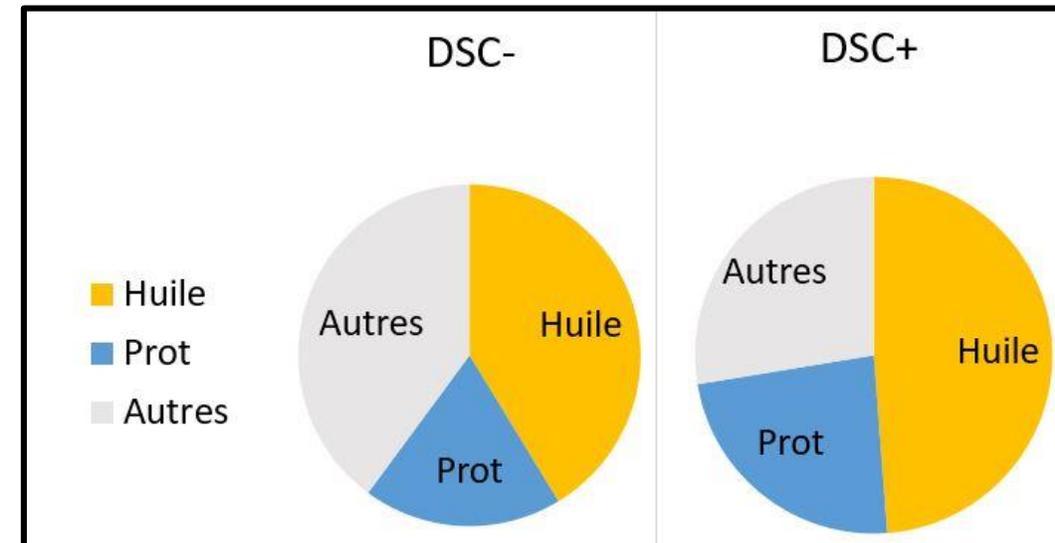
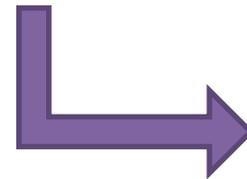
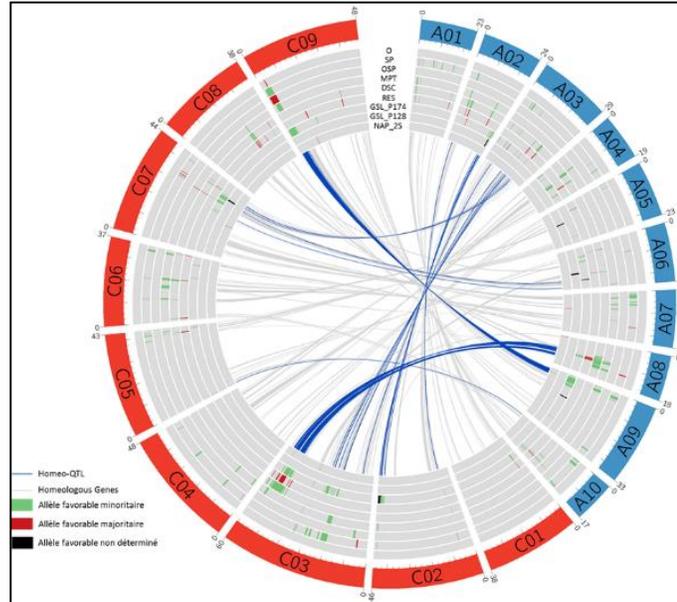
Caractérisation des polysaccharides pariétaux (*i.e. fibres*) des graines

DSC et polysaccharides : hypothèse

- DSC, delta seed composition



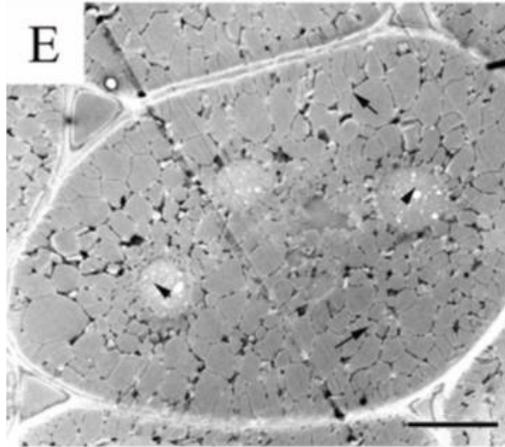
- 259 QTL - Nombreuses colocalisations (DSC/RES)



Polysaccharides pariétaux

La paroi végétale

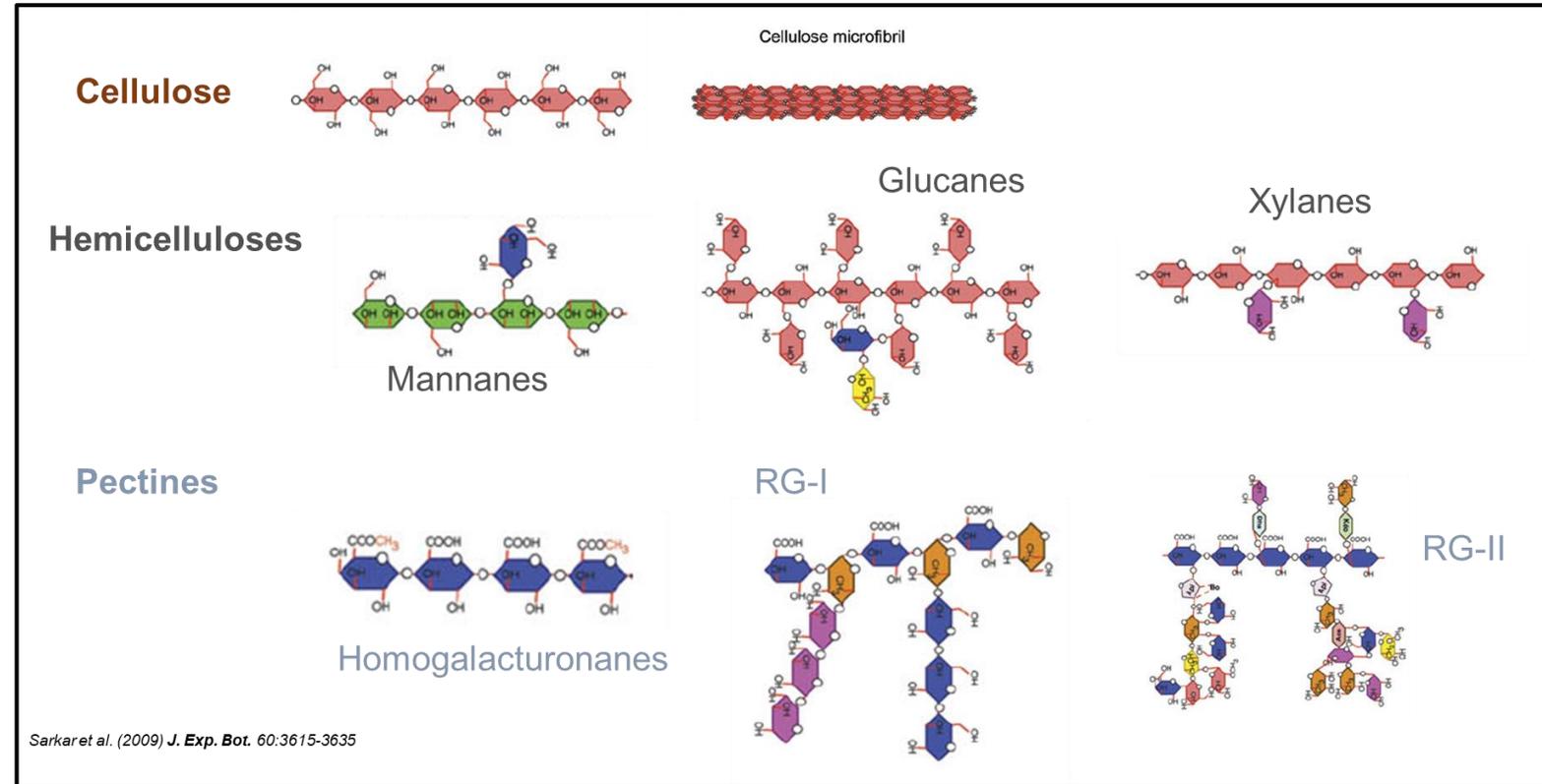
Structure **rigide** et **dynamique** localisée en périphérie des cellules végétales



Assemblage de ≠ polymères : **polysaccharides**, protéines, lignines

- **Substances pectiques** solubles dans l'eau avec les chélatants du calcium
- **Hémicelluloses** solubles dans les bases diluées
- **Cellulose** insoluble dans les acides et les bases dilués

Répartition ≠ : s. pectiques abondants dans lamelle moyenne, cellulose dans paroi secondaire





Polysaccharides pariétaux (*i.e* « fibres »)

● Objectifs de SEEDQUAL :

- Etude de la variabilité de composition en polysaccharides pariétaux de la graine de colza 
- Recherche de marqueurs métaboliques du DSC   
- Développement de modèles prédictifs NIRS 



Etude de la variabilité des polysaccharides (PS) de la graine de colza

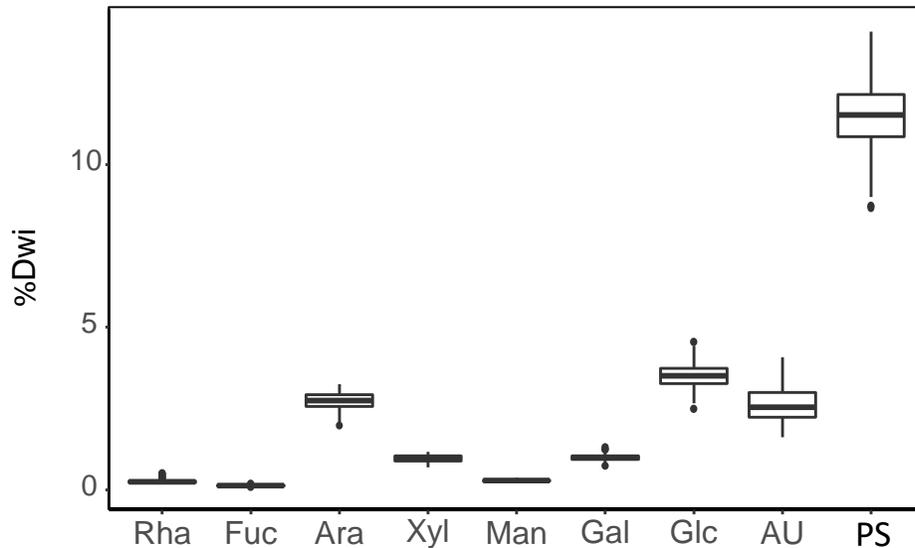
-> Criblage chimique d'une collection de graines de colza (n=92 lots, 3 rep techniques)

PS totaux (%Dwi)	Glc	Fuc	Man	Xyl	Rha	Gal	Ara	AU	PS
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

Cellulose

Hémicelluloses

Pectines



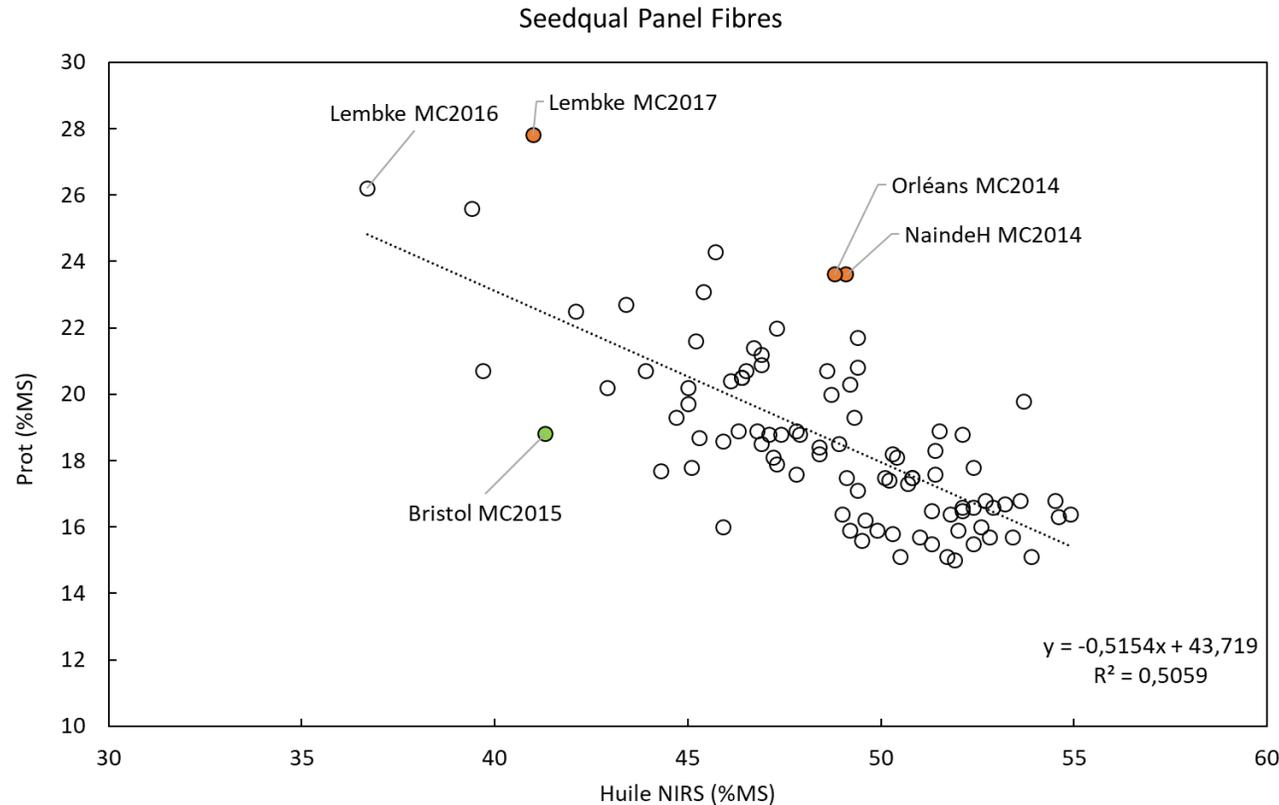
Faible variabilité : Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal

Variabilité + importante : Ara, Glc, AU & PS totaux



Etude de la variabilité des polysaccharides (PS) de la graine de colza

Corrélation avec le DSC Résidus et oses constitutifs des PS



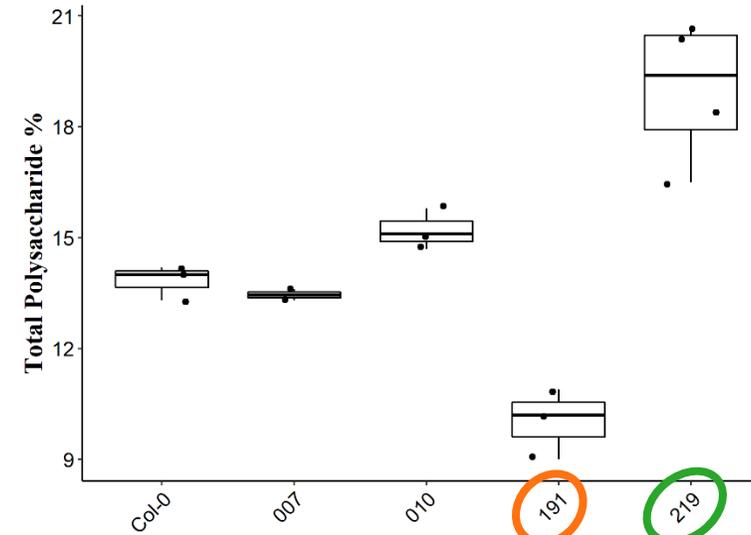
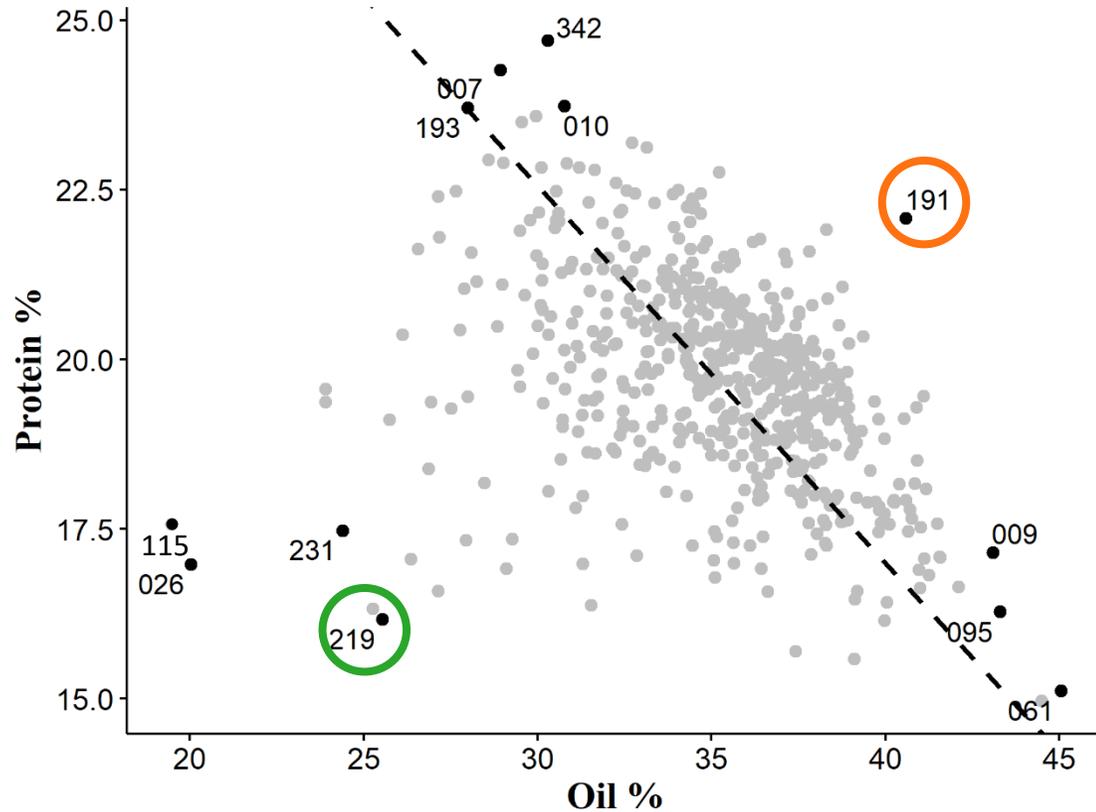
	Ara	Glc	AU	PS
Lembke MC2017	2,2	3,5	2,8	10,6
Orléans MC2014	2,2	2,8	1,9	9,2
NaindeH MC2014	2,2	2,8	1,7	8,7
mediane (n=92)	2,7	3,5	2,5	11,5
Bristol MC2015	3,1	4,1	3,6	13,8

DSC + en orange = pauvres en PS

DSC - en vert = riche en PS



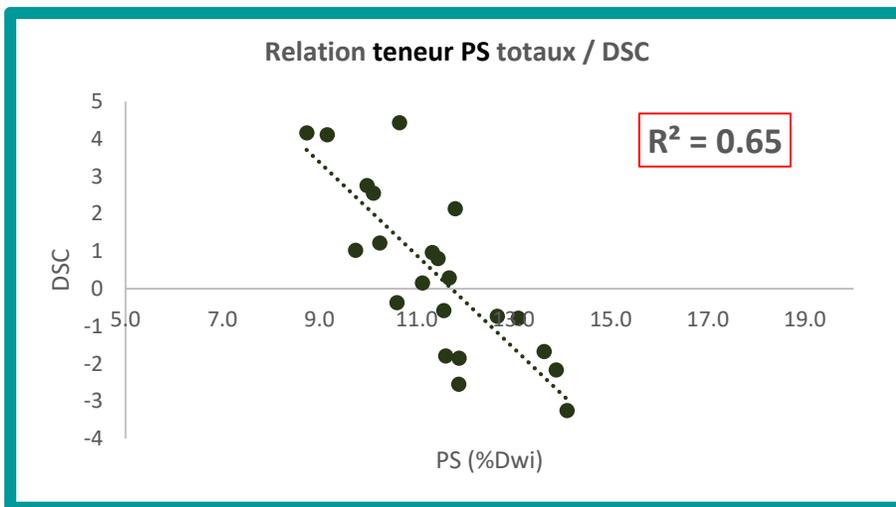
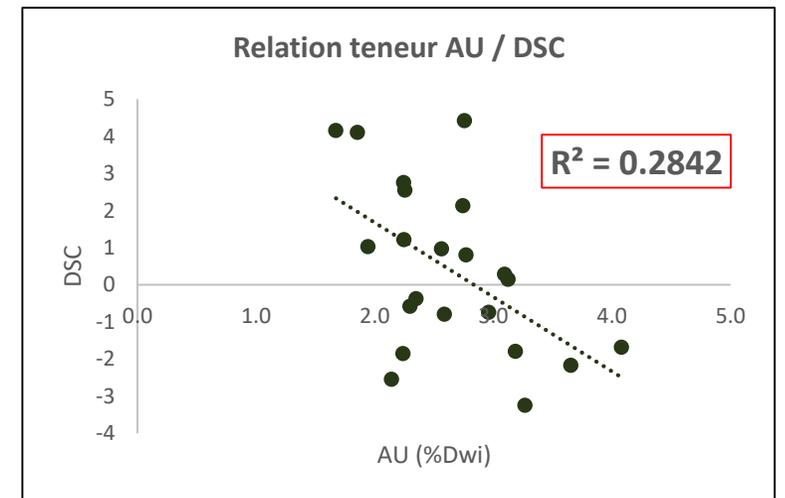
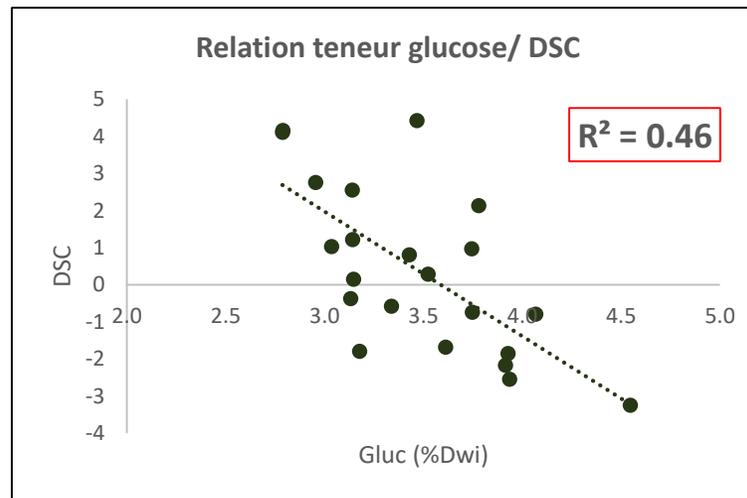
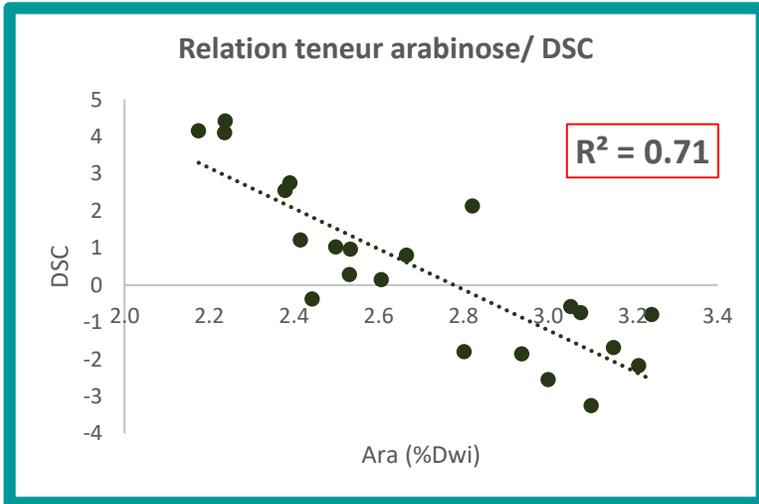
Etude de la variabilité des polysaccharides pariétaux de la graine d'*Arabidopsis*



DSC + en orange = pauvres en PS
DSC - en vert = riche en PS

Recherche de marqueurs métaboliques pour le DSC - colza

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

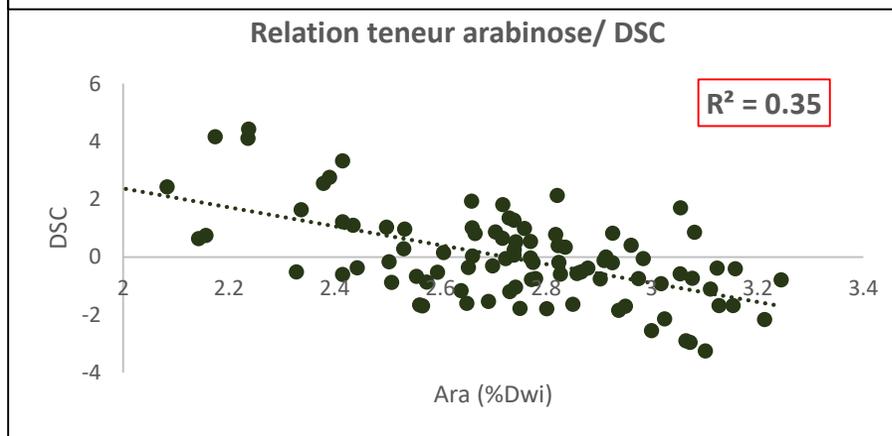
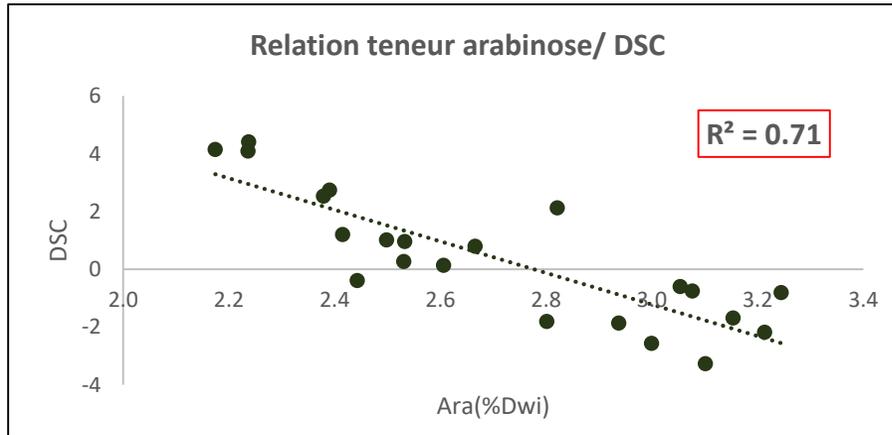


Bonne corrélation DSC / arabinose et DSC/PS
Est-ce que l'arabinose est un bon marqueur pour le DSC ?

Recherche de marqueurs métaboliques pour le DSC - colza

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

20 accessions



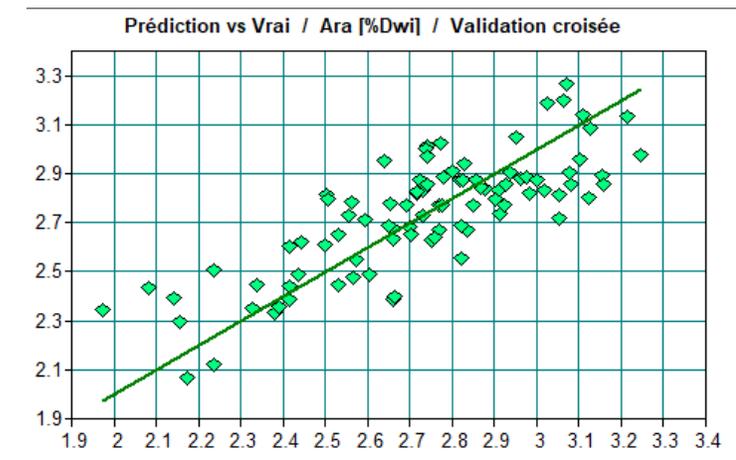
Panel complet (92)



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

Développement de calibrations NIRS Ara/Glc/AU/PS totaux

= augmenter les capacités de phénotypage pour
augmenter nombre de données réinjecter dans les
corrélations DSC / Ara-Glc-AU-PS

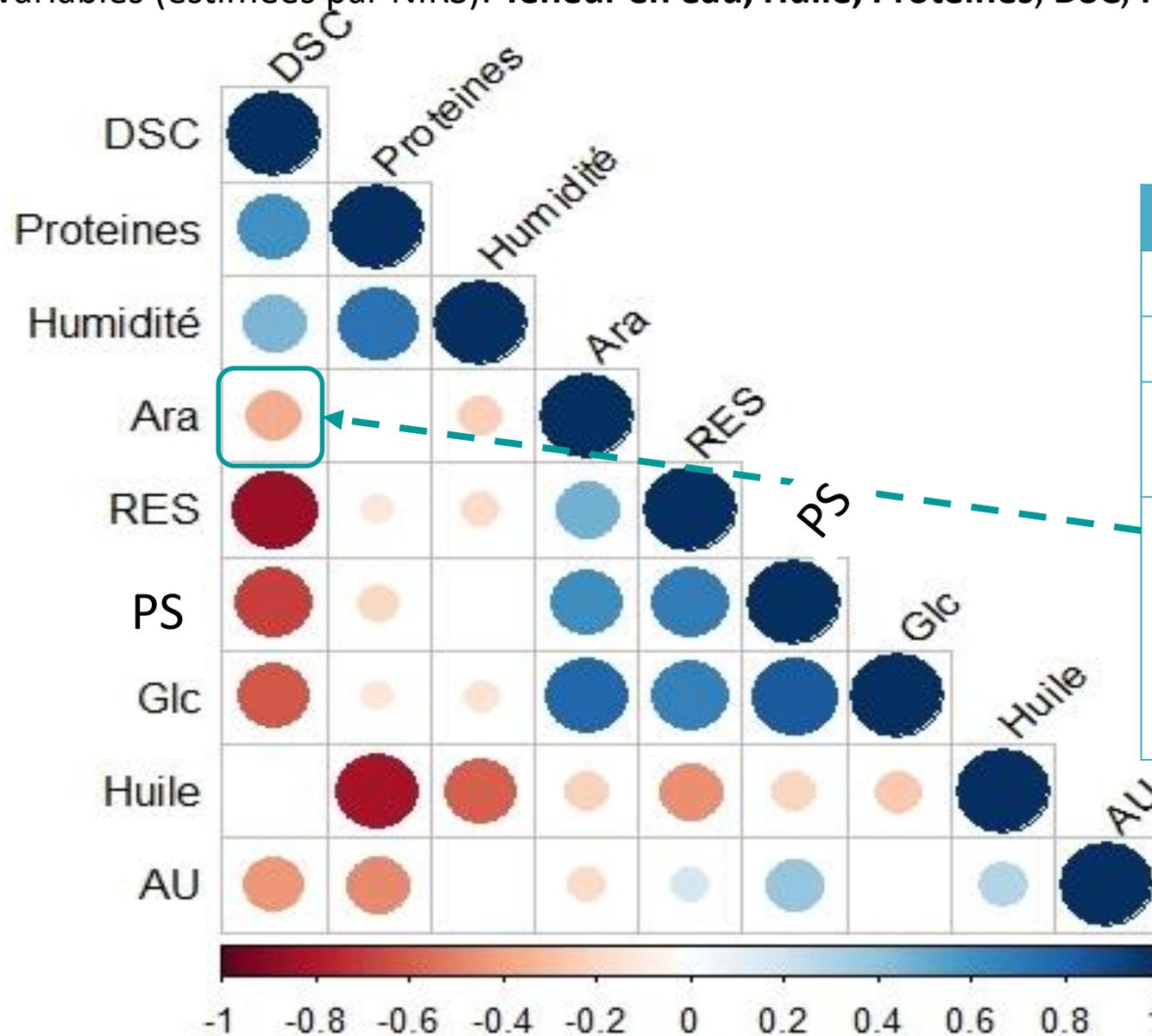




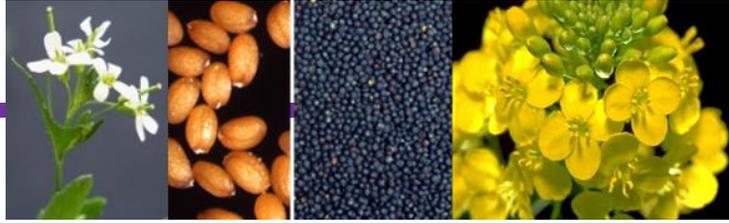
Recherche de marqueurs métaboliques pour le DSC – colza : panels SEEDPROT-SEEDQUAL

Variables (estimées par NIRS): Teneur en eau, Huile, Protéines, DSC, résidus, 2S*, 12S*, Arabinose*, Glucose*, AU*, PS*.

* : modèles NIRS SEEDPROT/SEEDQUAL restant à optimiser – prédictions sous réserve



Variables	Coeff de corrélation	
Huile/Prot	0.83	
RES/DSC	0.85	
DSC/PS	0.68	PS n'est pas le seul contributeur au RES
DSC/Ara	0.37	Ara n'est pas un marqueur universel du DSC... L'ajout de données par NIRS n'améliore pas cette corrélation

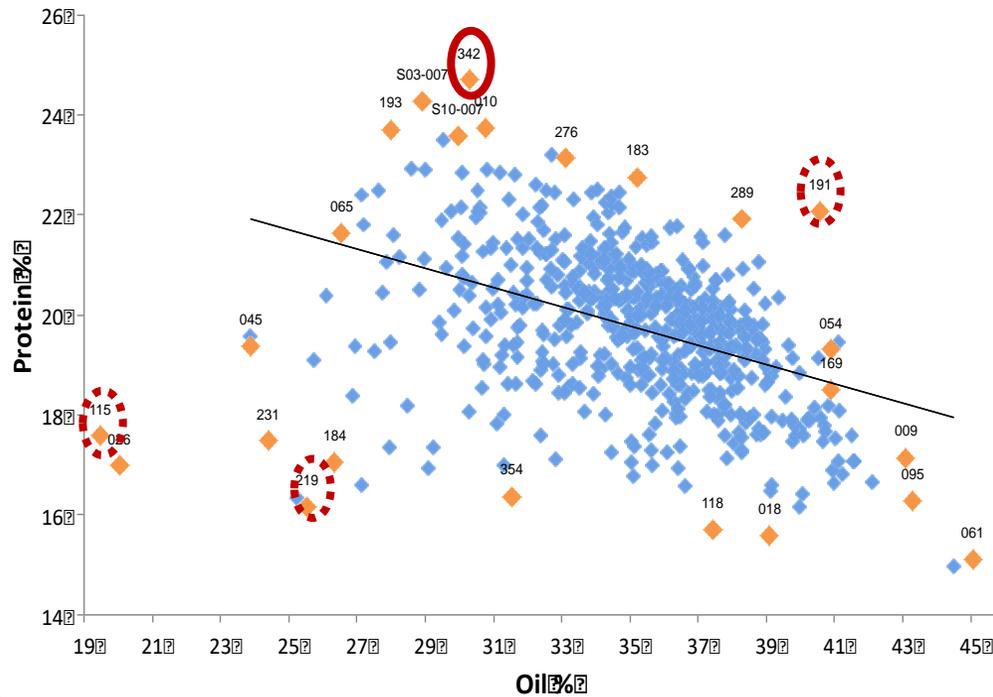


**Comprendre les mécanismes moléculaires
conduisant au phénotype DSC+/- :
identification de mutants affectés pour le DSC
et cartographie par séquençage des gènes responsables chez *Ath***





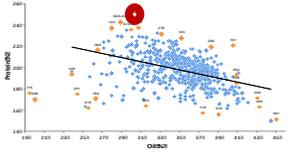
Phénotypage d'une population de mutants homozygotes



◆ 24 mutants avec des teneurs contrastées en huile, protéines et DSC

=> FOCUS sur 4 mutants au DSC élevé (+ ou -) ○

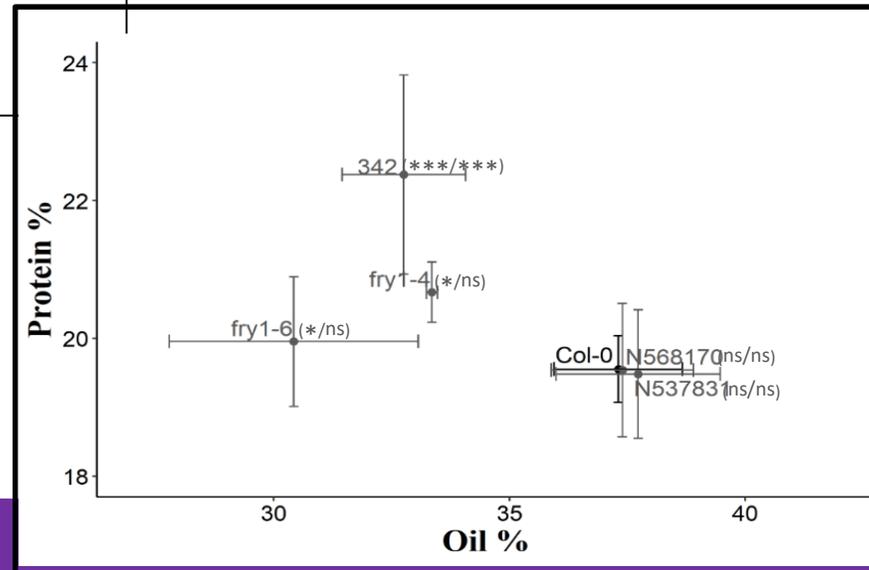
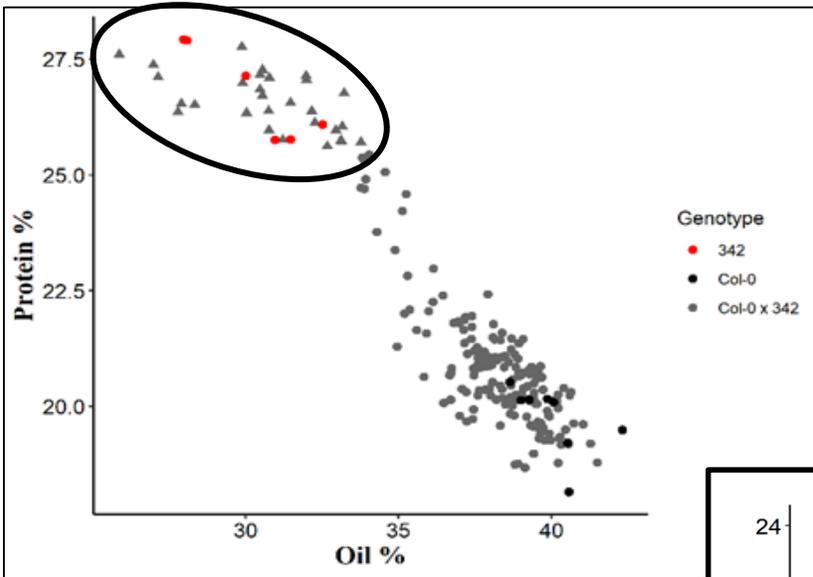
-> Objectif : Identification des gènes causaux



➤ Mutant 342 : riche en huile et en protéines

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* responsable du phénotype du mutant 342 :

➔ **[fry1-4] = [mutant 342]**

Confirmation par tests d'allélisme

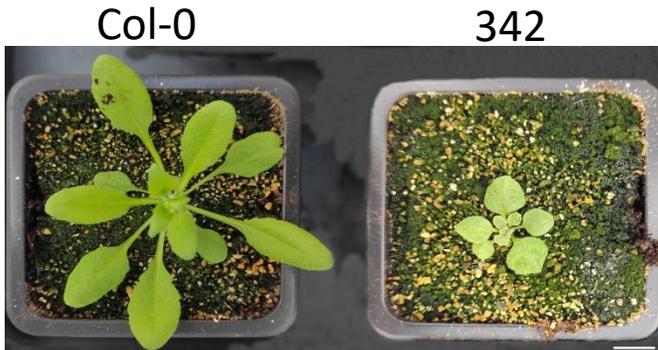
Complémentation fonctionnelle du mutant 342 avec le gène *FRY1* en cours...



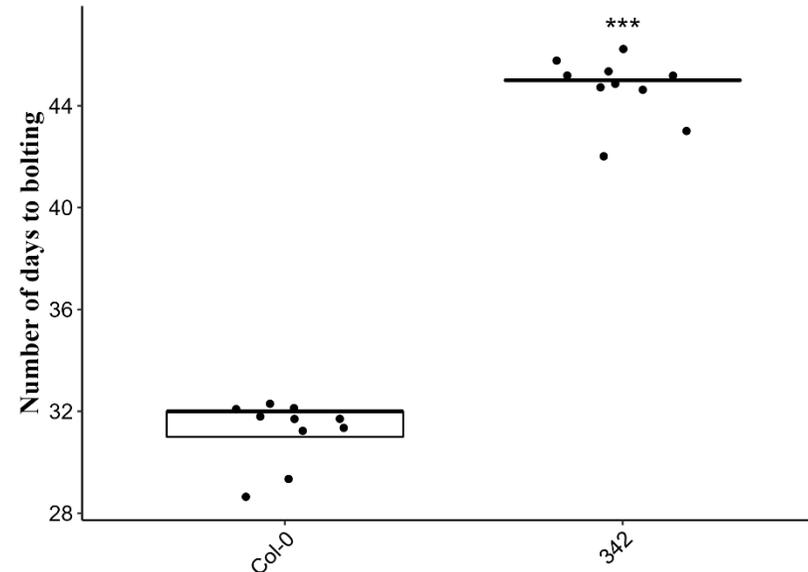
Les graines des mutants *fry1* ont un profil intéressant : riches en huile ET en protéines...

... MAIS ces mutants *fry1* présentent des problèmes de croissance, un retard de floraison et un rendement en graines réduit :

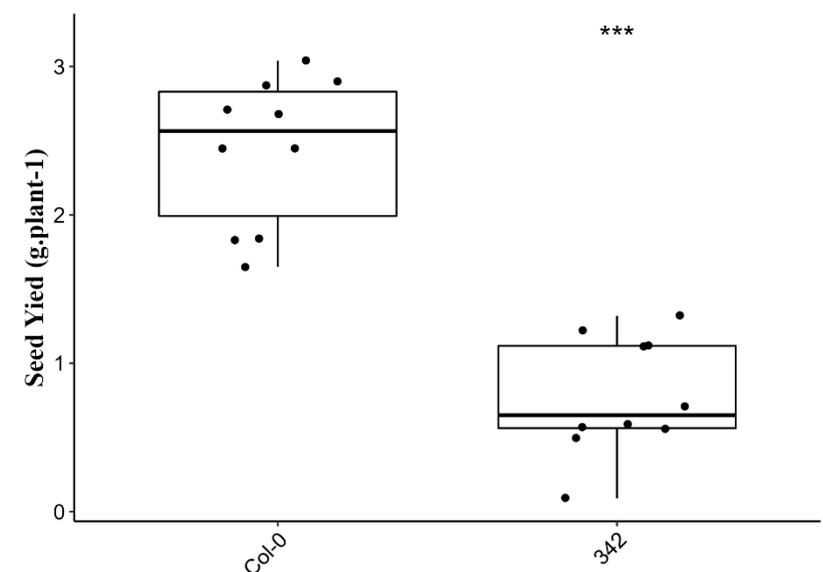
Croissance



Floraison



Rendement



S. Jasinski
P. Guerche



Orthologues du gène *FRY1* chez *Brassica napus*



- **BLAST du gène *At5g63980* sur le génome *B. napus* (v10)**
identification de 6 orthologues
- **Etude lien haplotype/phénotype :**

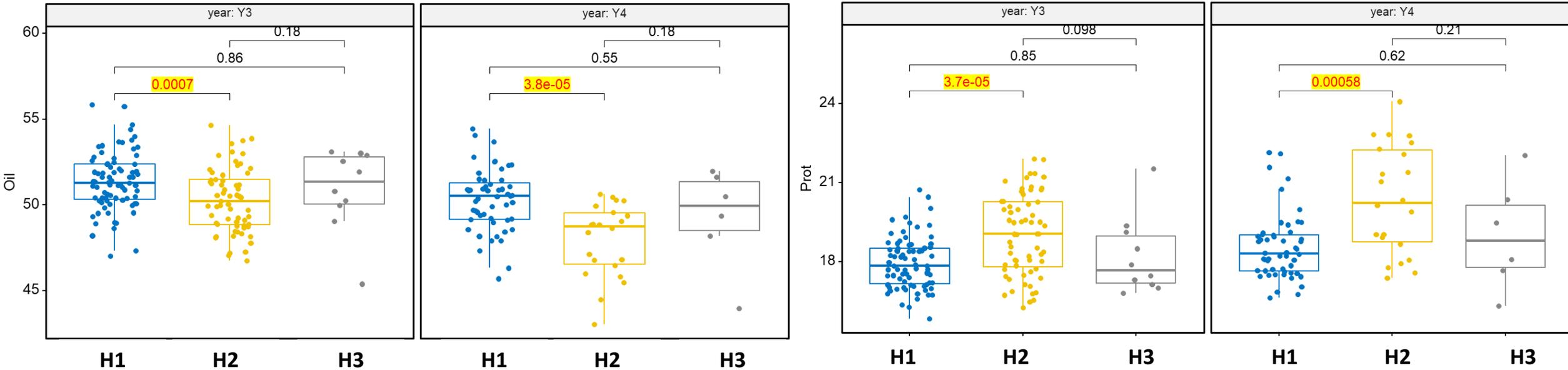
Sur un panel de 169 accessions :

-> SNP issues puce 60K + Exome Capture

-> [huile] et [protéines] x 2 années

Chromosome	Nombre d'haplotypes totaux	Nombre d'haplotypes fqce >5%	Nombre d'accessions par haplotype (fqce >5%)
A02	4	2	H1 : 141 / 169 H2 : 8 / 169
A06	1	1	H1 : 166 / 169
A09	5	3	H1 : 111 / 169 H2 : 11 / 169 H5 : 29 / 169
C02	3	3	H1 : 78 / 169 H2 : 63 / 169 H3 : 10 / 169
C03	4	2	H1 : 129 / 169 H2 : 27 / 169
C09	2	1	H1 : 157/169

Exemple sur le chromosome C02 : 3 haplotypes (H1 : 78/169; H2: 63/168 ; H3 : 10/169)



-> Haplotype 2 du C02 significativement différent * pour les teneurs en huile et protéines, sur les 2 années de récolte

* Test wilcoxon

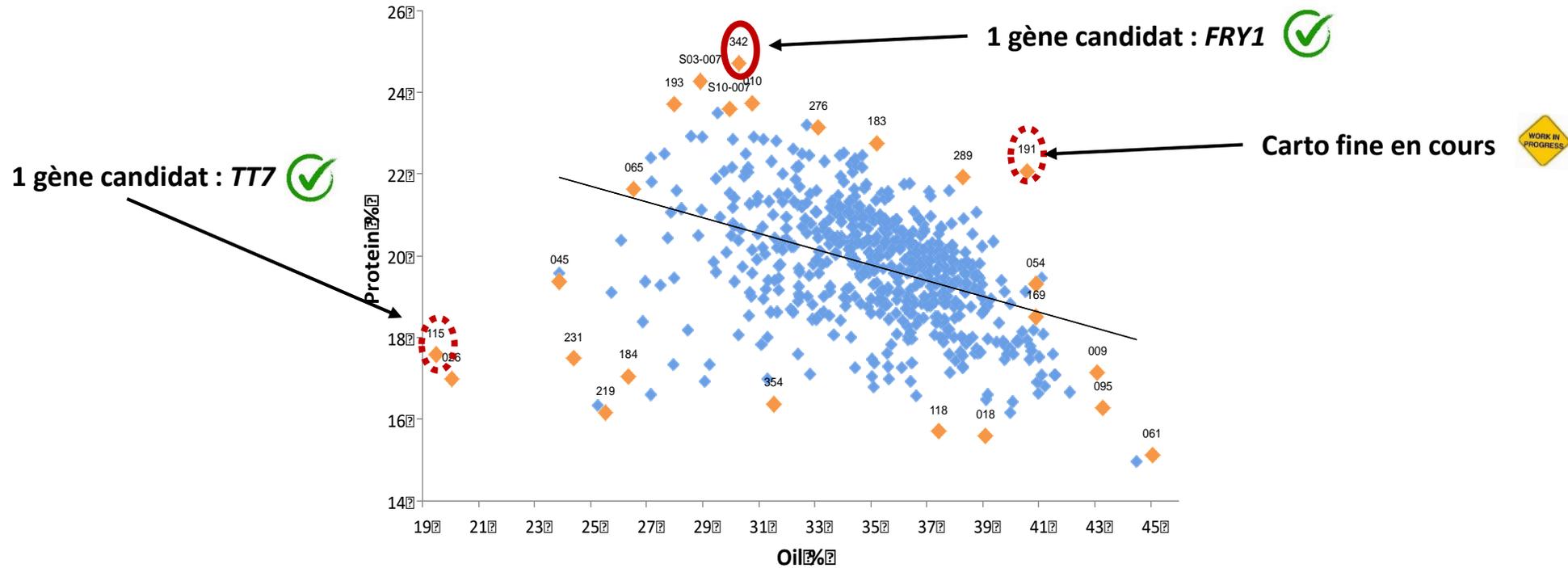


A suivre :

- Finaliser les études chromosome / chromosome puis en combinant les haplotypes
- Lien avec les QTL de la qualité de la graine
- Etude de l'impact des mutations sur la protéine FRY1

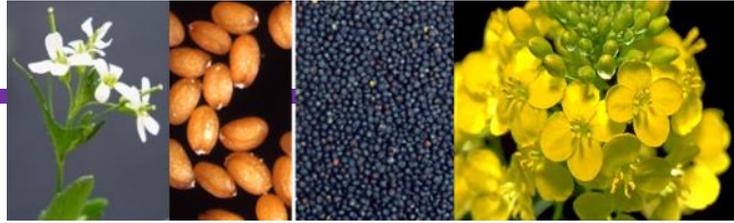


Conclusions et perspectives



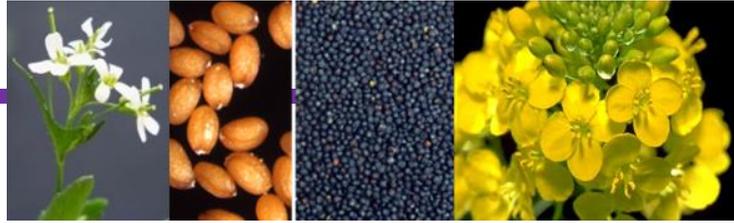
Prochaine étape : validation fonctionnelle des gènes candidats chez *Arabidopsis*

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



Partie 2 :

Caractérisation de la composition en protéines de réserve des graines de colza



Rendement d'extraction des protéines dans la collection

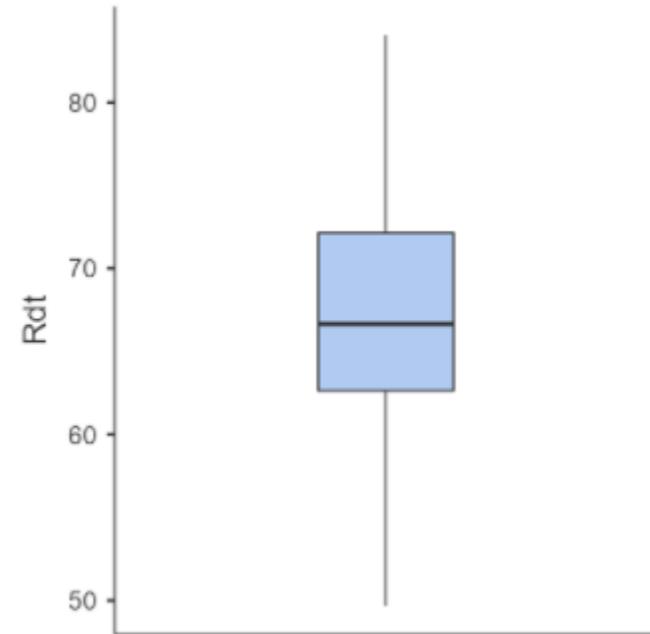
- Composition des extraits protéines totales:



- Paramètres:

- $\text{teneur en protéines totales extraites}(\% \text{ MS}) = N \times 5,7 \times \text{rdt tx}$

- $\text{Rendement d'extraction} (\%) = \frac{\text{prot tot extraites}(\%)}{\text{prot graines} (\%)}$

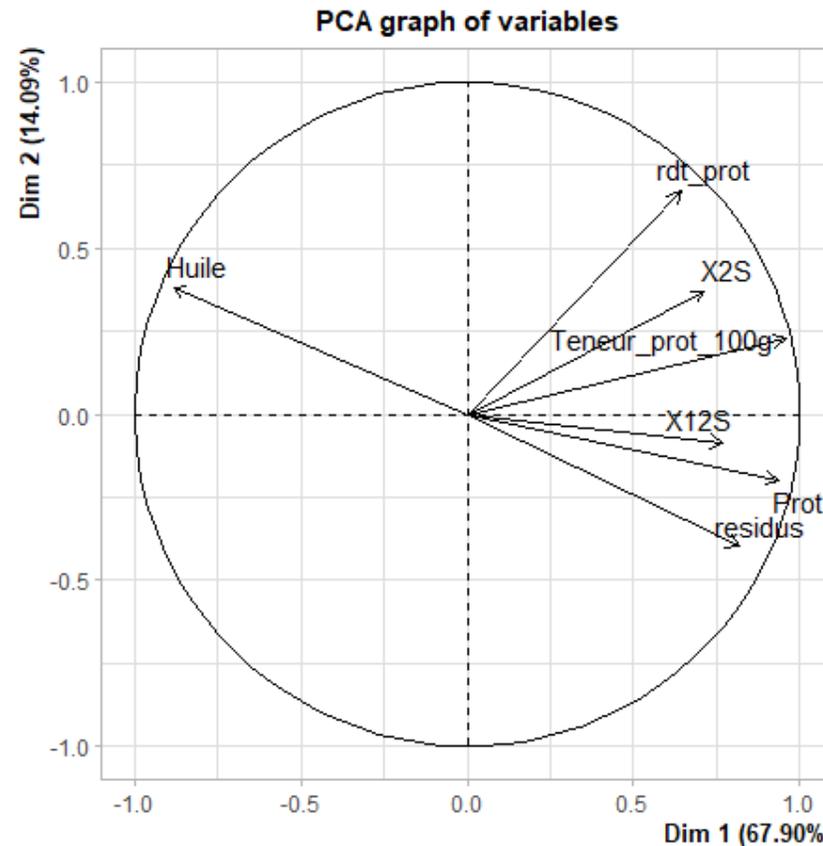


⇒ Rendement d'extraction varie de 50 à 84%



Solubilité des protéines

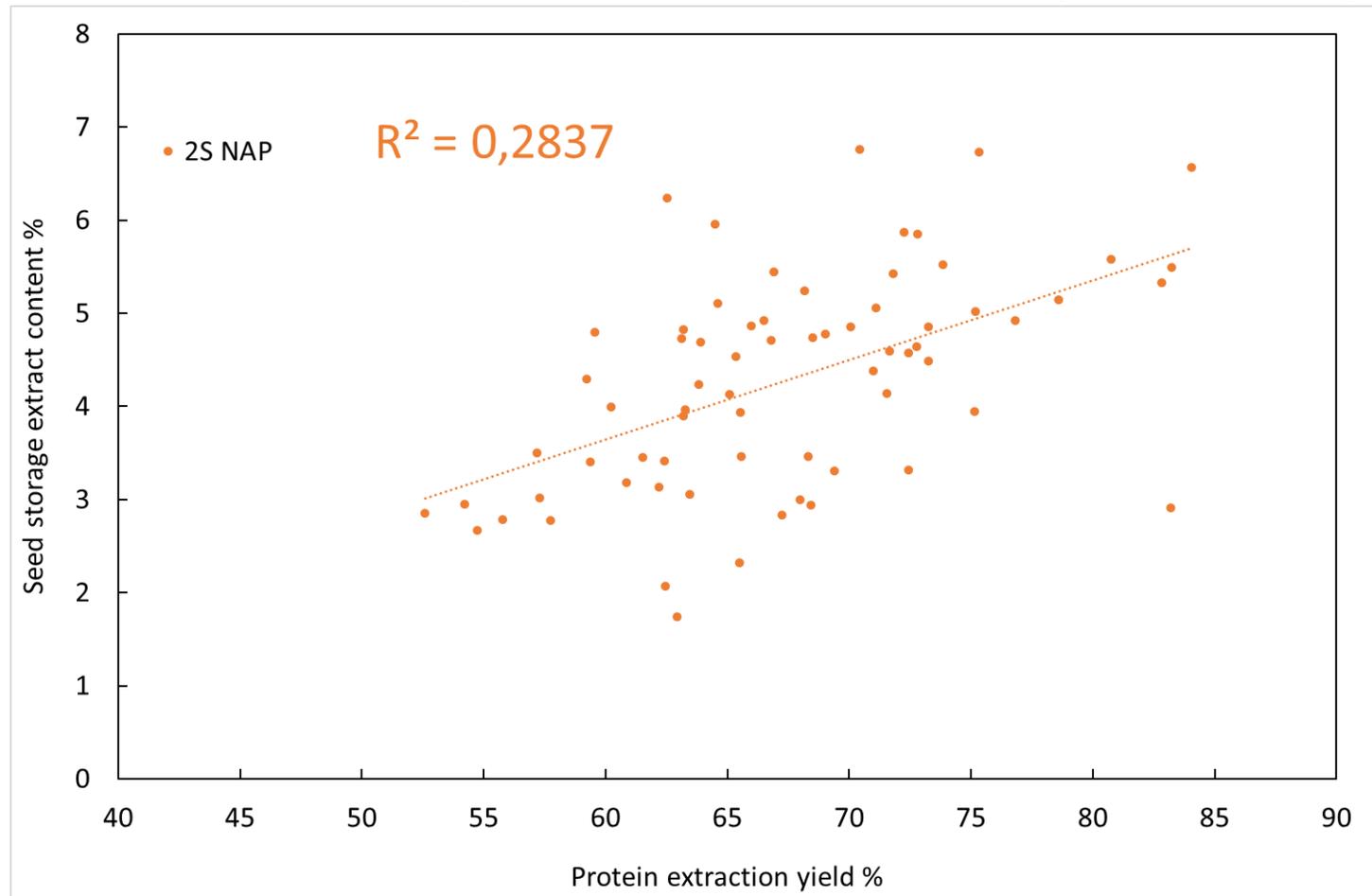
- Comment expliquer les écarts de solubilité ?
 - Composition de la graine (eau, lipides, protéines, polysaccharides)
 - Interactions entre biopolymères
 - Composition des protéines de réserve : Solubilité 2S > Solubilité 12S > Solubilité oleosine



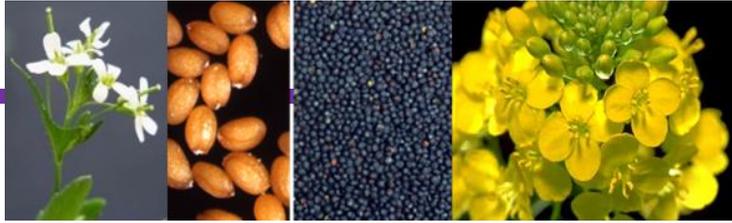


Solubilité des protéines

- Composition des extraits protéines totales et composition en protéines de réserve



⇒ Rendement d'extraction faiblement corrélé à la composition en protéines de réserve

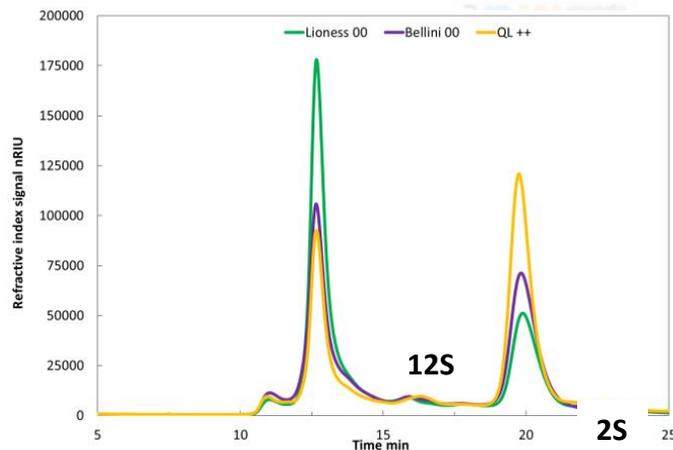


Compréhension du lien entre composition en protéines de réserve et d'autres variables de la graine de colza (glucosinolates)

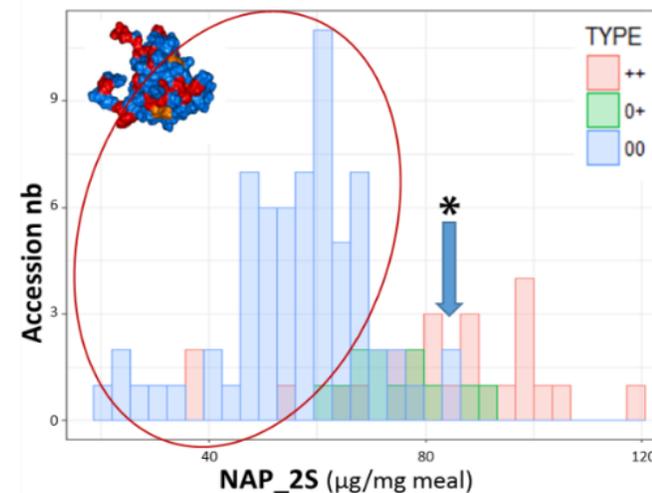
La sélection du colza pour la qualité de la graine a modifié la balance 2S/12S des protéines de réserve de la graine (SSP)

Quantification de SSP

UR 1268 **bia** Biopolymères Interactions Assemblages



Distribution des 2S dans la graine

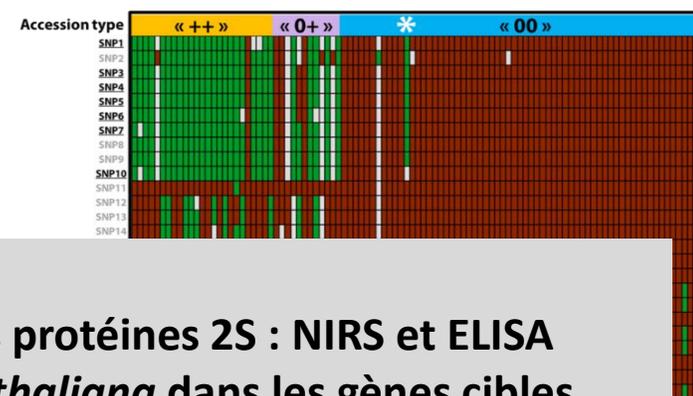


Allelic distribution in WOSR (A09-1_2S QTL)

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

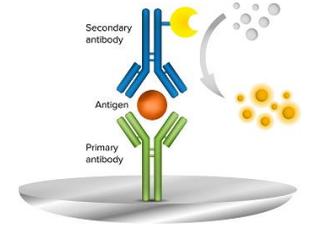


Mise au point d'une méthode de dosage des 2S haut débit : ELISA

● Résultats

Variabilité de la mesure très importante pour un même échantillon (de 2% à 112%)

- incertitude de mesure ?
- conservation des échantillons dégradation à la congélation / décongélation ?



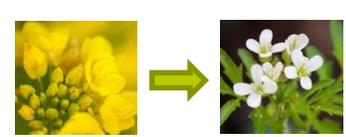
● Validation de méthode selon profil d'exactitude

Validité de la gamme dans une zone de concentration très resserrée

● Effet sur la structure des protéines ?

- de la congélation / décongélation
- De la dilution (ng/ml pour 12S)





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

Chromosome	Gènes sous QTL
A09 - 1	MYB34 (voie du tryptophane, auxine et gluco) GTR2 (glucosinolate transporter)
A09 - 2	-
A09 - 3	APK APS kinase (voie des glucosinolates)
C02	GTR 2
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*



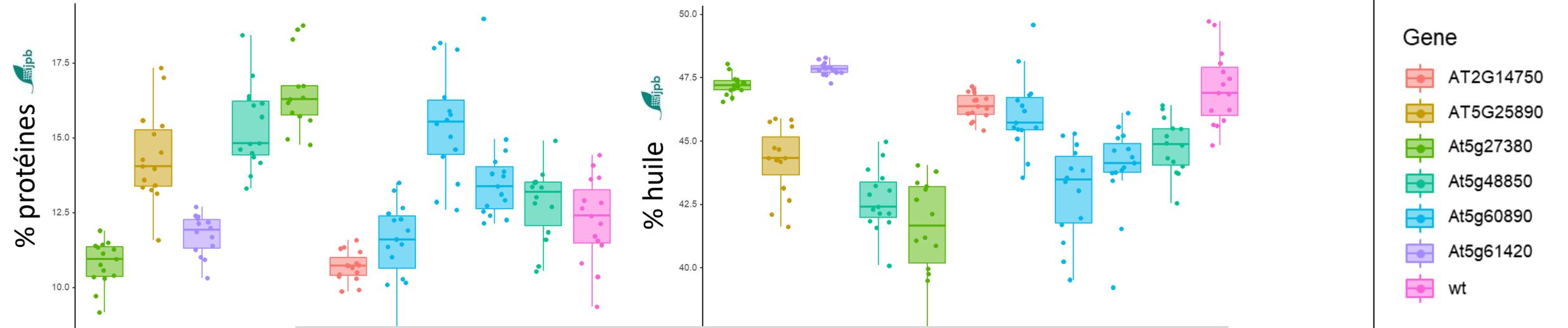
Gènes orthologues *Arabidopsis thaliana* : mutants d'insertion (SALK Institute)

- **Sélection des mutants SALK**
 - 1 à 3 lignées en fonction du gène cible
- **Culture des 10 lignées homozygotes pour phénotypage (+ Col 0 en témoin wt)**
 - 15 plantes par lignée
 - Phénotypage :
 - NIRS : contenu en huile et protéines (IJPB) ✓
 - Teneur en soufre (analyse élémentaire) (IGEPP) ✓
 - Teneur en glucosinolates (IGEPP – P2M2) ✓
 - Teneur en SSP – 2S/12S (BIA) ✓

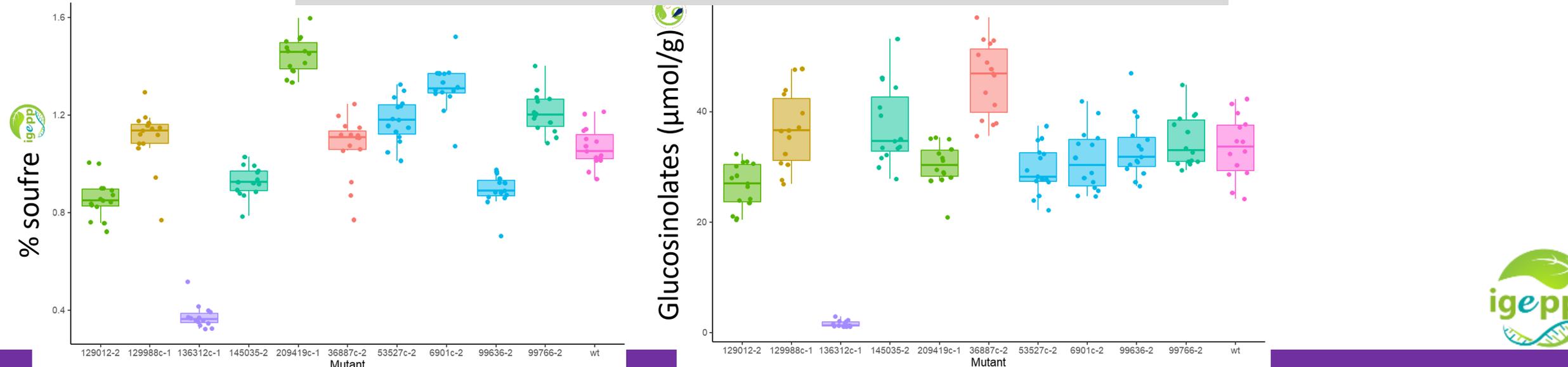


➔ **Identifier le(s) gène(s) responsables du phénotype observé**

Phénotypage des mutants : premiers résultats...



-> en attente des dosages des protéines 2S...



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

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

Finalisation de l'**identification et la caractérisation fonctionnelle** des loci DSC+/DSC- chez *Arabidopsis*

Transfert des modèles NIRS fibres aux partenaires (*en cours*)

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

Variabilité de l'extraction des protéines peu liée à la composition en protéines de réserve

ELISA sandwich quantitatif: à finaliser ⇒ outil de détection d'allergène pour la 2S ?

Compréhension du lien entre la teneur en napines (2S) et en glucosinolates de la graine de colza, *via* l'analyse des mutants d'*Arabidopsis thaliana* : à finaliser

● **Valorisation**

Communication orale congrès (Graines 2023)

Valorisation sous forme d'articles (FRY1, SSP, fibres)

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



- Nathalie Marnet, Solenne Berardocco, Sophie Charton

- **Copil SEEDQUAL**

Françoise Labalette, Philippe Fouillard, Jean-Claude Pruvost, Sandrine Legros, Clara Simon, Diane Leforestier

- **Collègues de l'IGEPP**