



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO  
FACULTE DES SCIENCES  
DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT  
EQUIPE D'ACCUEIL DOCTORAL BIOTECHNOLOGIE

\*\*\*\*\*

Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat



**Etude des bases génétiques de l'efficacité de  
l'utilisation de l'azote du riz pluvial  
(*Oryza sativa* L.) à Madagascar**

présentée par

*RAKOTOSON Luciano Tatiana*

soutenue publiquement le 22 février 2019

Devant les membres du jury composés de :

- Président : Madame RAKOUTH Bakolimalala, Professeur  
Directeur de thèse : Madame RATSIMALA RAMONTA Isabelle, Professeur titulaire  
Co-directeur de thèse : Monsieur RABOIN Louis Marie, Docteur  
Rapporteur interne : Madame RAFARASOA Lala Sahondra, Professeur  
Rapporteur externe : Monsieur RAMANANTSOANIRINA Alain, Directeur de recherche associé  
Examineurs : Monsieur RAKOTOMALALA Jean Jacques, Directeur de recherche  
: Monsieur RANDRIAMBOAVONJY Jean Chrysostome, Professeur titulaire  
Invitées : Madame DUSSEYER Julie, Docteur  
: Madame RAKOTOARISOA Noronirina Victorine, Docteur





UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

EQUIPE D'ACCUEIL DOCTORAL BIOTECHNOLOGIE

\*\*\*\*\*

Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat

**Etude des bases génétiques de l'efficience de  
l'utilisation de l'azote du riz pluvial  
(*Oryza sativa* L.) à Madagascar**

présentée par

*RAKOTOSON Luciano Tatiana*

soutenue publiquement le 22 février 2019

Devant les membres du jury composés de :

Président : Madame RAKOUTH Bakolimalala, Professeur

Directeur de thèse : Madame RATSIMALA RAMONTA Isabelle, Professeur titulaire

Co-directeur de thèse : Monsieur RABOIN Louis Marie, Docteur

Rapporteur interne : Madame RAFARASOA Lala Sahondra, Professeur

Rapporteur externe : Monsieur RAMANANTSOANIRINA Alain, Directeur de recherche associé

Examineurs : Monsieur RAKOTOMALALA Jean Jacques, Directeur de recherche

: Monsieur RANDRIAMBOAVONJY Jean Chrysostome, Professeur titulaire

Invitées : Madame DUSSERRE Julie, Docteur

: Madame RAKOTOARISOA Noronirina Victorine, Docteur





## Remerciements

Cette thèse est le fruit de plusieurs années de travail où j'ai vécu des périodes de bonheur et aussi de stress et de découragement, mais heureusement pour moi, j'ai pu compter sur l'aide et le soutien des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Je tiens d'abord à remercier madame RAKOUTH Bakolimalala, Professeur, Enseignant Chercheur à la mention Biologie et Ecologie Végétales à la Faculté des Sciences, d'avoir accepté de présider ce jury malgré ses lourdes occupations au sein de la Faculté.

Je remercie aussi madame RATSIMALA RAMONTA Isabelle, Professeur titulaire, Enseignant Chercheur à la mention Biologie et Ecologie Végétales à la Faculté des Sciences, d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse malgré ses nombreuses occupations et le nombre d'étudiants qu'elle a encadré. Je suis reconnaissante envers madame RAKOTOARISOA Noronirina Victorine, Docteur, Enseignant Chercheur à la mention Biologie et Ecologie Végétales et Vice Doyenne à la Faculté des Sciences, d'avoir assuré la codirection de cette thèse malgré ses lourdes tâches au niveau de la Faculté, et aussi d'être parmi les membres de jury.

Je remercie beaucoup aussi mon co-directeur de thèse, monsieur RABOIN Louis Marie, Docteur, Chercheur à l'Unité Propre de Recherche-AIDA au CIRAD Montpellier, de m'avoir encadrée et apporter ses aides lors des travaux sur terrain avec ses plusieurs années d'expériences surtout à Madagascar. Travailler sous sa direction a été très enrichissant, tant par ses expériences que par ses compétences en génétique. Je tiens à lui exprimer ici ma profonde gratitude.

Je remercie également madame RAFARASOA Lala Sahondra, Professeur, Enseignant Chercheur à la mention Entomologie, Culture, Elevage et Santé à la Faculté des Sciences, et Coordinatrice du Dispositif de Partenariat SPAD, d'avoir accepté d'être le rapporteur interne en examinant préalablement ce document de thèse malgré ses nombreuses occupations au niveau de la Faculté et au niveau de DP SPAD. Je remercie aussi monsieur RAMANANTSOANIRINA Alain, Sélectionneur et Directeur de recherche associé au FOFIFA Antsirabe, d'être le rapporteur externe malgré ses diverses fonctions au niveau de la station régionale de recherche du FOFIFA Antsirabe.

Je remercie aussi monsieur RANDRIAMBOAVONJY Jean Chrysostome, Professeur titulaire, Enseignant Chercheur au département des Eaux et Forêts de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, d'avoir accepté d'examiner cette thèse malgré ses nombreuses occupations. Je remercie également monsieur RAKOTOMALALA Jean Jacques, Chercheur Enseignant, Sélectionneur et Directeur de recherche au

FOFIFA, d'avoir accepté d'examiner ce document de thèse, malgré ses diverses occupations au niveau du Centre National de Recherche FOFIFA.

Je suis reconnaissante aussi envers madame DUSSERE Julie, Docteur, Chercheur à l'UPR-AIDA du CIRAD Montpellier, de m'avoir aidée tant au niveau de l'expérimentation qu'au niveau de l'exploitation des données et d'être parmi les membres de jury.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à monsieur AHMADI Nourollah, monsieur LETOURMY Philippe, monsieur ROUMET Pierre et madame CAO Tuong-Vi pour avoir été membres de mon comité de thèse et aussi contribuer aux articles scientifiques.

Je remercie aussi le DP SPAD (Dispositif de Partenariat, Système de Production d'Altitude et de Durabilité) de m'avoir accueillie en tant que doctorant, de donner diverses formations permettant de traiter les données et d'avoir préparé des journées scientifiques pour les doctorants afin d'aider et d'évaluer l'avancement de la thèse. Je remercie également les partenaires qui ont financé cette thèse, la fondation AGROPOLIS et CARIPLO, à travers le projet GSRUSE (Genomic Selection for Nitrogen Use Efficiency).

Je remercie aussi le CIRAD (à Madagascar et à Montpellier) pour l'accueil ici et lors des séjours à Montpellier et pour avoir dispensé diverses formations permettant d'écrire des articles scientifiques. Je remercie aussi le FOFIFA Antsirabe, de m'avoir accueillie et de me permettre d'utiliser ses laboratoires.

Je remercie également les chercheurs et les techniciens du FOFIFA (Patrick, Victor, Dieu Donné) et toutes les personnes qui m'ont aidée lors des travaux sur terrain qui étaient énormes.

Merci aux chercheurs du CIRAD que j'ai côtoyé lors de mon séjour à Montpellier, à l'URP AIDA et l'UMR AGAP, qui m'ont aidée à travers les discussions à propos de mon sujet de thèse, l'initiation et l'utilisation d'autres logiciels et le déblocage sur des scripts compliqués sur le logiciel R.

Merci à Philippe De Lajudie pour m'avoir accueillie durant mon séjour à Montpellier.

Une petite pensée à tous les doctorants, venus des quatre coins du monde, ayant passé avec moi un séjour au CIRAD Montpellier, Njaka, Tahina, Zo Elia, Manohisoa, Aditi, Manel, Diarietou, Ken, Essowe, Franchesco. J'exprime ici mes félicitations pour certains d'entre vous qui sont désormais docteurs et beaucoup d'encouragement pour ceux qui n'ont pas encore fini leur doctorat.

Je remercie aussi mes amies Saholy et Rova de toujours m'encourager. Merci à Laingo, Lalaina, Miora, Tahiry, Ando, Vero pour les moments passés ensemble ici à Madà ou lors de mon séjour à Montpellier, ces moments m'ont permis de me détendre et de me déstresser.

Je remercie déjà les lecteurs qui s'intéressent à cette thèse. Je sais que cette thèse n'est pas facile à suivre (beaucoup d'abréviations rien que sur une page) et comprendre surtout lors de la partie génétique (qui effraie tout le monde d'ailleurs), mais j'essaie de m'exprimer aussi claire que possible pour votre confort.

Et en dernier mais pas le moindre, un grand merci à toute ma famille, Dada, Neny, Aina et Herilala et sa famille, Toky, Domoina et Patrick, Fara, Rindra, pour votre amour, votre encouragement, votre soutien et votre prière. Je tiens à exprimer mes remerciements à dadafara Coco et nenifara Eva, pour leur aide, leur amour et leur soutien depuis ma première année d'études universitaires, qu'ils trouvent ici mon éternelle reconnaissance. Merci à Sœur Ursule, tatie Landy et sa famille, tonton Dovic et sa famille et tonton Frédéric et sa famille, tatie Vololona et sa famille, tonton Solofo et sa famille pour leur encouragement, leur soutien et aussi leur amour. Merci à mon fiancé et sa famille de me soutenir, m'aider, m'encourager et me faire passer d'agréables moments chaque fois qu'on s'est vu.

Je dédie cette thèse à mes parents et aussi à la mémoire de ma très chère grand-mère que j'aimais beaucoup, qui m'a quittée tôt et n'a pas pu voir la fin de cette thèse.

*Un grand merci à tous !*

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>i</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des photos</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>xvii</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
I. Le riz à Madagascar .....	4
I.1. Origine du riz à Madagascar .....	4
I.2. Importance du riz : production et place socio-économique .....	4
I.3. Diversité génétique du riz à Madagascar .....	4
I.4. Différents types de riziculture à Madagascar .....	5
I.5. Le riz pluvial à Madagascar .....	5
I.5.1 Importance du riz pluvial .....	5
I.5.2. Les contraintes de la riziculture pluviale .....	6
I.5.3. La sélection variétale du riz pluvial à Madagascar .....	10
II. Efficience de l'utilisation de l'azote (« Nitrogen Use Efficiency » NUE) .....	11
II.1. Définition de l'efficience de l'utilisation de l'azote (NUE) .....	13
II.2. Efficience d'absorption de l'azote (« Nitrogen Uptake Efficiency », NUPE) .....	13
II.2.1. Influence des caractéristiques racinaires sur NUPE .....	15
II.2.2. Gènes impliqués dans l'absorption du nitrate .....	16
II.3. Efficience de l'utilisation de l'azote (« Nitrogen Utilization Efficiency », NUTE) .....	19
II.3.1. Influence des caractéristiques agronomiques sur NUTE .....	19
II.3.2. Gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote .....	20
II.3.2.1. Réduction du nitrate .....	20
II.3.2.2. Assimilation de l'ammonium .....	20
II.3.3. Gènes impliqués dans la remobilisation de l'azote .....	23
II.4. Amélioration génétique de l'efficience de l'utilisation de l'azote NUE .....	24
II.4.1. Variabilité génétique de l'efficience de l'utilisation de l'azote .....	24

II.4.2. Déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote .....	25
III. Génétique d'association pour étudier les bases génétiques des caractères complexes .....	27
III.1. Déséquilibre de liaison .....	28
III.1.1. Définition et mesure .....	28
III.1.2. Étendue du déséquilibre de liaison.....	29
III.2. Structure de la population.....	31
III.2.1. Méthodes d'inférence de la structure Q .....	32
III.2.1.1. Arbre phylogénétique .....	32
III.2.1.2. Modèle explicite avec le logiciel STRUCTURE.....	32
III.2.1.3. Analyse en composantes principales (ACP).....	33
III.2.2. Méthodes d'inférence de l'apparentement ou du kinship K .....	33
III.3. Cartographie de QTL par analyse d'association.....	33
III.3.1. Approche par gènes candidats ou par balayage du génome entier.....	33
III.3.2. Les modèles statistiques utilisés.....	34
III.3.3. Avantages et limites de l'analyse d'association GWAS .....	35
III.4. Études d'association chez le riz.....	36

**Chapitre II : VARIABILITE GENETIQUE DE L'EFFICIENCE DE L'UTILISATION DE L'AZOTE DU RIZ PLUVIAL..... 38**

I. Introduction.....	38
II. Matériels et méthodes.....	40
II.1. Description du site, matériel végétal.....	40
II.2. Conduite des cultures .....	41
II.3. Dispositif expérimental et niveau d'azote.....	43
II.4. Echantillonnage et mesure phénotypique .....	43
II.4.1. Mesure de la biomasse, du rendement et des composantes du rendement.....	43
II.4.2. Mesure de la teneur en azote .....	45
II.4.3. Mesure d'autres caractères agronomiques.....	45
II.5. Analyses statistiques .....	45
III. Résultats .....	46
III.1. Interaction du génotype et du niveau d'azote avec l'année.....	46
III.2. Effet de l'application de l'engrais azoté .....	49
III.3. Interaction entre génotype et niveau d'azote .....	51



III.4. Contribution de ses composantes (NUPE et NUTE) à la variation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote.....	52
III.5. Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et les autres caractères agronomiques .	54
IV. Discussions .....	58
V. Conclusion partielle du chapitre II.....	61

**Chapitre III : ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DE L'EFFICIENCE DE L'UTILISATION DE L'AZOTE DU RIZ PLUVIAL ..... 63**

I. Introduction.....	63
II. Caractérisation phénotypique du NUE et d'autres caractères agronomiques associés dans un panel de 198 variétés de riz pluvial, à deux niveaux d'azote contrastés .....	63
II.1. Introduction.....	63
II.2. Matériels et méthodes .....	63
II.2.1. Site expérimental .....	63
II.2.2. Matériel végétal .....	64
II.2.3. Conduite agronomique et niveaux d'azote appliqués.....	64
II.2.4. Dispositif expérimental .....	65
II.2.5. Mesure de la biomasse, du rendement et ses composantes .....	67
II.2.6. Mesure de la teneur en azote .....	67
II.2.7. Mesure de l'efficacité de l'utilisation de l'azote .....	67
II.2.8. Analyses statistiques.....	69
II.3. Résultats .....	70
II.3.1. Analyse de la variation des caractères étudiés .....	70
II.3.2. Effet du niveau de la fertilisation azotée sur les caractères étudiés .....	72
II.3.3. Interaction génotype × niveau de fertilisation azotée.....	74
II.3.4. Contribution de leurs composantes à l'efficacité de l'utilisation de l'azote et au rendement en grains .....	77
II.3.4.1. Contribution de NUPE et NUTE à la variation du NUE .....	77
II.3.4.2. Contribution de ses composantes à la variation du rendement en grains.....	80
II.3.5. Relation entre NUE et l'ensemble des autres caractères mesurés .....	82
II.4. Discussions .....	86
II.5. Conclusion partielle de la partie II.....	88
III. Étude d'association pangénomique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et des caractères qui lui sont liés sur le riz pluvial .....	88
III.1. Introduction .....	89

III.2. Matériels et méthodes .....	91
III.2.1. Matériel végétal, dispositif expérimental et mesure phénotypique des caractères ....	91
III.2.2. Génotypage .....	92
III.2.3. Structure de la diversité génétique et déséquilibre de liaison .....	92
III.2.4. Analyse d'association.....	93
III.3. Résultats et discussions .....	93
III.3.1. Évaluation de NUE et d'autres caractères agronomiques .....	93
III.3.2. Structure de la diversité génétique et étendue du déséquilibre de liaison.....	93
III.3.3. Validation de l'association marqueur-caractère à travers 4 gènes candidats (GW5, GS3, Awn1 et Glabrous 1) .....	95
III.3.4. Analyse GWAS de NUE et d'autres caractères agronomiques .....	99
III.3.5. Coïncidence entre groupes haplotypiques (QTLs) associés à différents caractères	100
III.3.6. Identification des gènes candidats.....	102
III.4. Conclusion partielle de la partie III .....	114
IV. Conclusion partielle du chapitre III .....	114
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>I</b>

**Abstract**

**Résumé**

## Liste des figures

Figure 1: Courbe des températures minimales et moyennes à Ivory et Andranomanelatra de novembre 2010 à mai 2011.....	7
Figure 2: Quelques variétés créées depuis les années 90 jusqu'en 2012 par FOFIFA/CIRAD et comparaison de leur rendement en fonction de l'année de leur première diffusion.....	11
Figure 3: Évolution de la consommation mondiale en engrais azotés (en bleu) et phosphorés (en vert) depuis 1960 jusqu'en 2000.....	12
Figure 4: Fonction de nitrate transporter (NRT) d' <i>Arabidopsis thaliana</i> dans les cellules de la racine et de la tige.....	18
Figure 5: Mécanismes de l'assimilation et de la remobilisation de l'azote dans les jeunes feuilles (A) et dans les feuilles sénescents (B).....	21
Figure 6: Comparaison entre détection de QTL dans une population en ségrégation (a) et détection d'association dans un panel (b).....	28
Figure 7: Décroissance du déséquilibre de liaison en fonction du temps, du taux de recombinaison (r) et du déséquilibre de liaison initial (D0).....	30
Figure 8: Exemple de l'extinction du déséquilibre de liaison au sein de différents groupes de l'espèce <i>Oryza sativa</i> .....	31
Figure 9: Exemples de différentes structurations d'une population rencontrées dans les études d'association.....	32
Figure 10: Schéma des approches de cartographie de QTL par analyse d'association.....	34
Figure 11: Distribution de la pluviométrie cumulée par décennie, date de semis, date de floraison moyenne et de récolte moyenne, date d'apport d'azote lors des trois campagnes de riz (2013 à 2015) à Ivory.....	41
Figure 12: Relation entre rendement en grains obtenus à faible et à fort niveau d'azote.....	49
Figure 13: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et l'efficacité d'absorption de l'azote (NUPE) (a); entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) et l'efficacité de conversion de l'azote (NUTE) (b) et entre NUPE et NUTE (c) pour les combinaisons de traitements de trois années × deux niveaux d'azote pour 13 variétés de riz pluvial.....	53
Figure 14: Corrélation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) avec chacun des caractères agronomiques (poids de mille grains (TGW), nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), nombre de panicules par mètre carré (PANM2), rendement en pailles (SY), biomasse à floraison (BFL), indice de surface foliaire (LAI), date de floraison (DTFL), indice de récolte (HI), pourcentage de grains pleins (FG)) du riz pluvial, par année et niveau d'azote.....	56
Figure 15: Corrélation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) avec chacun des caractères agronomiques (teneur en azote des grains (GNC), azote absorbé à floraison (FLNUP), teneur en azote de la plante à floraison (FLNC), efficacité de conversion de l'azote (NUTE), efficacité d'absorption de l'azote (NUPE), azote absorbé à post-floraison (POSTFLNUP), indice de récolte	

azoté (NHI), azote total absorbé par la plante (TNUP), teneur en azote des pailles (SNC)) du riz pluvial, par année et niveau d'azote .....	57
Figure 16: Pluviométrie mensuelle à Ivory pendant les deux campagnes de riz pluvial (2014-2015 et 2015-2016).....	64
Figure 17: Schéma du dispositif expérimental avec 14 blocs de 16 variétés à deux niveaux d'azote (en haut) et vue détaillée d'un bloc (en bas).....	66
Figure 18: Relations entre le rendement en grains à fort (HN) et à faible (LN) niveau d'azote, par année, sur le panel de 198 variétés de riz pluvial.....	75
Figure 19: Relation entre le nombre de panicules par mètre carré à fort (HN) et à faible (LN) niveau d'azote (a) et relation entre le nombre d'épillets par panicule à fort niveau (HN) et à faible niveau (LN) d'azote (b).....	76
Figure 20: Relation entre le pourcentage de grains pleins à fort (HN) et à faible (LN) niveau azote (a) et .... relation entre le poids de mille grains à fort (HN) et à faible (LN) niveau d'azote (b).....	77
Figure 21: Corrélation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE), le rendement en grains (GY), l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) et l'efficacité de la conversion de l'azote (NUTE) du riz pluvial, par niveau d'azote en 2015 (à gauche) et en 2016 (à droite).....	79
Figure 22: Corrélation entre le rendement en grains (GY) et ses composantes (nombre de panicules par mètre carré (PANM2), nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), pourcentage de grains pleins (FG) et poids de mille grains (TGW)) du riz pluvial, par niveau d'azote et par année, en 2015 (à gauche) et en 2016 (à droite).....	81
Figure 23: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la date de floraison par niveau d'azote par année (2015 et 2016) du riz pluvial.....	82
Figure 24: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la teneur en azote des grains du riz pluvial, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016).....	84
Figure 25: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la teneur en azote des pailles du riz pluvial, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016).....	84
Figure 26: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et le rendement en pailles, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016), du riz pluvial.....	85
Figure 27: Relation entre le rendement en grains et la teneur en azote des grains, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016), du riz pluvial.....	85
Figure 28: Structure génétique des variétés de riz représentée par l'arbre de type « Neighbour-joining ».	94
Figure 29: Comparaison des courbes d'extinction du déséquilibre de liaison entre le panel de 190 variétés de riz utilisées dans cette étude (coloré en rouge) et le panel de référence du groupe japonica tropical (coloré en noir) .....	94
Figure 30: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène Awn1 de longueur de l'aristation du grain.....	96

Figure 31: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène <i>Glabrous 1</i> de la pilosité du grain.....	97
Figure 32: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène <i>GS3</i> de la longueur du grain .....	98
Figure 33: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène <i>GW5</i> de la largeur du grain.....	98

### **Liste des photos**

Photo 1: Pyriculariose foliaire (a) et pyriculariose paniculaire (b) sur le riz pluvial.....	8
Photo 2: Parcelles de riz pluvial infestées par <i>Striga asiatica</i> .....	9

## Liste des tableaux

Tableau 1: Différentes définitions de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE).....	14
Tableau 2: Études d'association chez le riz publiées après la revue de Zhang et al. (2016).....	37
Tableau 3: Principales caractéristiques des 13 variétés de riz pluvial utilisées dans l'étude.....	42
Tableau 4: Description des 21 caractères mesurés sur le riz pluvial .....	44
Tableau 5: Valeur F de Fisher et significativité des 21 caractères mesurés à partir de l'analyse de la variance combinant les facteurs année, génotype et niveaux d'azote et valeur de l'héritabilité au sens large ( $H^2$ ) à faible niveau d'azote (LN) et à fort niveau d'azote (HN) pour chacun des caractères.....	47
Tableau 6: Valeur phénotypique moyenne, corrélation et pourcentage de variation entre les deux niveaux d'azote des 21 caractères agronomiques mesurés sur le riz pluvial .....	50
Tableau 7: Contribution de l'efficacité d'absorption de l'azote (NUPE) et de l'efficacité de conversion de l'azote (NUTE) à la somme des carrés de l'efficacité de la conversion de l'azote (NUE) sur 13 variétés de riz pluvial, par niveau d'azote et par année.....	54
Tableau 8: Calendrier cultural lors des essais sur le riz pluvial à Ivory pendant 2 campagnes : date d'apport d'azote, de floraison et de récolte. ....	65
Tableau 9: Différents caractères mesurés sur 198 variétés de riz pluvial.....	68
Tableau 10: Test F, test Z et test t de l'analyse de variance des 16 caractères étudiés sur le panel de riz pluvial.....	71
Tableau 11: Valeur phénotypique par année et par niveau d'azote des 16 caractères agronomiques mesurés sur le panel de 198 variétés de riz pluvial. Pourcentage de variation, corrélation entre niveau d'azote et héritabilité à chaque niveau d'azote pour les 16 caractères étudiés. ....	73
Tableau 12: Contribution de ses composantes (NUPE et NUTE) à la variation de NUE .....	78
Tableau 13: Contribution du nombre de panicules par mètre carré (PANM2), du nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), du pourcentage de grains pleins (FG) et du poids de mille grains (TGW) à la variation du rendement en grains (GY), par année et par niveau d'azote .....	80
Tableau 14: Coefficient de corrélation de Pearson entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et les autres caractères (hauteur de la plante, date de floraison, teneur en azote des pailles, teneur en azote des grains, rendement en pailles, poids de mille grains, nombre d'épillets par panicule, nombre de	

panicules par mètre carré, pourcentage de grains pleins, indice de récolte azoté, azote total absorbé par la plante, indice de récolte) du riz pluvial, par niveau d'azote et par année ..... 83

Tableau 15: Nombre d'occurrences de marqueurs détectés en commun pour chaque combinaison de caractères (partie haute et droite du tableau) et nombre d'occurrences de colocalisations de signaux d'associations dans un même haplotype pour chaque combinaison de caractères (partie basse et gauche du tableau).....101

Tableau 16: Liste des associations marqueurs-caractères significatives détectées dans le panel pour les 21 caractères agronomiques ..... 105

## Liste des annexes

Annexe 1: Diversité génétique des 13 variétés étudiées et équation de calibration pour la concentration en azote dans les grains et pailles lors de l'essai préliminaire.....	I
Annexe 2: Valeur phénotypique des 21 caractères étudiés et valeur de la corrélation entre NUE, ses composantes et le rendement en grains lors de l'essai préliminaire .....	III
Annexe 3 : Liste des 198 variétés utilisées dans les essais .....	XIII
Annexe 4 : Valeur de la distribution phénotypique des caractères étudiés par niveau d'azote et par année .....	XVIII
Annexe 5 : Représentation de la structure génotypique du panel de 190 variétés étudiées.....	XIX
Annexe 6: Article publié et traduit en français au chapitre II.....	XX
Annexe 7 : Article à soumettre et traduit en français dans la partie III du chapitre III .....	XXX
Annexe 8: Résumé de la communication orale au Forum de la Recherche, 5 <sup>ème</sup> édition, 29-30 novembre 2017, Fianarantsoa - Madagascar.....	XXXIX



## Liste des abréviations

ACP	: Analyse en Composantes Principales
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AEN	: « Agronomic Efficiency of N », efficience agronomique de l'azote apporté
AL	: « Awn Length », longueur de l'aristation du grain
AMT	: « Ammonium Transporter », transporteur d'ammonium
AS	: Asparagine Synthétase
ASS	: Afrique Subsaharien
ATP	: Adénosine Triphosphate
BAD	: Banque Africaine pour le Développement
BFL	: « Biomass at Flowering », biomasse de la plante à la floraison
BLUP	: « Best Linear Unbiaised Predictor », meilleur prédicteur linéaire non biaisé
Chr	: Chromosome
CIAT	: « International Center for Tropical Agriculture », centre de recherche international pour l'agriculutre tropicale en Colombie
CIRAD	: Centre de coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement
Cm	: Centimètre
CSSLs	: « chromosome segment substitution line »
DARwin	: « Dissimilarity Analysis and Representation for windows »
DL	: Déséquilibre de liaison
DTFL	: « Days to Flowering », nombre de jours entre le semis et la floraison
DTH3	: « Days to Heading 3 », gène responsable de l'épiaison, situé sur le chromosome 3
EMBRAPA	: « Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária », entreprise Brésilien de recherche agricole
FAO	: « Food and Agriculture Organization of the United Nation », organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation
FG	: « Filled Grain », pourcentage de grains pleins
FLNC	: « Flowering Nitrogen Content », teneur en azote de la plante à floraison
FLNUP	: « Flowering Nitrogen Uptake », azote absorbé par la plante à la floraison
FOFIFA	: « FOibe-mpirenena momba ny Fikarohana ampiharina amin'ny Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra », Centre National de Recherche Appliquée au Développement Rural-CENRADERU
GBS	: « Genotyping by Sequencing », génotypage par séquençage
GDH	: Glutamate Déshydrogénase
GL	: « Grain Length », longueur du grain

GLN	: Glutamine
GNC	: « Grain Nitrogen Content », teneur en azote des grains
GOGAT	: Glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase ou Glutamate synthase.
GP	: « Grain Pilosity», pilosité du grain
GS	: Glutamine synthétase
GS3	: « Grain Size 3 », gène responsable de la taille des grains, situé sur le chromosome 3
GT	: « Grain Thickness», épaisseur du grain
GW	: « Grain Width», largeur du grain
GW5	: « Grain Width 5 », gène responsable de l'épaisseur des grains, situé sur le chromosome 5
GWAS	: « Genome Wide Association Study», étude d'association pangénomique
GY	: « Grain Yield », rendement en grains
H <sup>2</sup>	: Héritabilité
Ha	: Hectare
HATS	: « High Affinity Transporter System », système de transport à haute affinité
HI	: « Harvest Index », indice de récolte
HN	: « High Nitrogen », fort niveau d'azote
IBS	: « Identical by State », identité par état
INSTAT	: Institut National de la Statistique
IPCC	: « Intergovernmental Panel on Climate Change», organisation intergouvernementale pour le changement climatique
IRGSP	: « International Rice Genome Sequencing Project», projet international de séquençage du génome du riz
J	: Jours
Kb	: Kilobase
Kg	: Kilogramme
LATS	: « Low Affinity Transporter System », système de transport à faible affinité
LD	: « Linkage Disequilibrium », déséquilibre de liaison
LN	: « Low Nitrogen », faible niveau d'azote
LOD	: « Logarithm of odds », coefficient de probabilité
MAEP	: Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche
MAF	: « Minor Allele Frequency », fréquence de l'allèle mineur
Mb	: Mégabase
N	: Azote
NAR	: « Nitrate Assimilation-Related »

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	: Ion ammonium
NHI	: « Nitrogen Harvest Index », indice de récolte azoté
NiR	: Nitrite Réductase
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Ion nitrite
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Ion nitrate
NPF	: « Nitrate/Peptide transporter Family », famille de transporteur de nitrate/peptide
NR	: Nitrate Réductase
NRT	: « Nitrate Transporter », transporteur de nitrate
NUE	: « Nitrogen Use Efficiency », efficacité de l'utilisation de l'azote
NUPE	: « Nitrogen Uptake Efficiency », efficacité de l'absorption de l'azote
NUTE	: « Nitrogen Utilization Efficiency », efficacité de conversion ou d'utilisation de l'azote
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement Economiques
PANM2	: « Panicle per square meter », nombre de panicules par mètre carré
PH	: « Plant Height », hauteur de la plante
PIB	: Produit Intérieur Brut
PNUE	: « Physiological Nitrogen Use Efficiency », efficacité physiologique de l'utilisation de N
POSTFLNUP	: « Post-Flowering Nitrogen Uptake », azote absorbé par la plante après la floraison
PTR	: « Peptide Transporter », transporteur de peptide
QTL	: « Quantitative Trait Loci », locus d'un trait quantitatif
REML	: « Restricted Maximum Likelihood », maximum de vraisemblance restreint
RILs	: « Recombinant Inbred Lines », lignées recombinantes et consanguines
SAUR	: « Small Auxin Up-Regulated », gène de la famille de l'auxine
SCV	: Semis direct sous couverture végétale
SEP	: « Standard Error of Prediction », erreur type de prédiction
SNC	: « Straw Nitrogen Content », teneur en azote des pailles
SNP	: « Single Nucleotide Polymorphism », polymorphisme d'un seul nucléotide
SPIPAN	: « Spikelet per panicle », nombre d'épillets par panicule
SSR	: « Simple Sequence Repeat », marqueurs microsatellites
SY	: « Straw Yield », rendement en pailles
TASSEL	: « Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage », logiciel d'analyse des traits par l'étude d'association, d'évolution et de liaison
TGW	: « Thousand Grain Weight », poids de mille grains
TNUP	: « Total Nitrogen Uptake », azote total absorbé par la plante à maturité

## Glossaire

Allèle : une version des formes que peut prendre un gène ou une séquence d'ADN à un locus.

Annotation : l'annotation du génome consiste à prédire et localiser l'ensemble des séquences codantes (gènes) du génome et à déterminer et identifier leur structure (annotation syntaxique = inventaire de l'ensemble des gènes contenus dans ce génome), leur fonction (annotation fonctionnelle = identification de toutes les régions codantes par l'analyse structurale du génome, qui conduit aux produits des gènes (ARN et protéines) qui doivent être caractérisés par leurs propriétés, structures et fonctions), ainsi que les relations entre les entités biologiques relatives au génome (annotation relationnelle).

Cluster : ensemble de deux gènes ou plus, qui dérivent d'un ancêtre unique par duplications successives. Étant donné que les populations ayant un ancêtre commun ont tendance à posséder les mêmes sortes de cluster de gènes, ils sont utiles pour retracer l'évolution dans le temps de ses populations.

Déséquilibre de liaison : relation entre deux allèles à deux locus dans une population. Elle existe lorsque la probabilité d'observer un couple d'allèles sur un chromosome n'est pas égale au produit des probabilités d'observer ces allèles individuellement.

Essartage: défrichage d'un terrain boisé effectué en arrachant et en brûlant son bois et ses broussailles.

Gène : segment d'ADN situé à un endroit bien précis (locus) sur un chromosome et porteur d'une information génétique. Il peut coder une protéine ou un ARN. Il comprend la séquence codante et des séquences qui en permettent et régulent l'expression.

Génome : ensemble de l'information génétique présente dans une cellule.

Germoplasme : ou plasma germinatif, expression utilisée pour décrire les ressources génétiques ou l'ADN d'un organisme et les collections de ce matériel génétique.

Haplotype: combinaison de plusieurs allèles situés sur des locus différents d'un même chromosome.

Locus : position des allèles sur le génome.

Marqueurs : fragments d'ADN qui servent de repère pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre. Ils renseignent sur le génotype d'un individu et ne sont pas modifiés par l'environnement.

Phénotype : ensemble des caractères observables, apparents, d'un individu, d'un organisme dus aux facteurs héréditaires et aux modifications apportées par le milieu environnant.

Pléiotropie: propriété d'un gène qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. On dit qu'un gène est pléiotrope s'il détermine à lui seul plusieurs caractères.

QTL : ou locus de caractère quantitatif, locus dont la variation allélique est associée à la variation d'un caractère quantitatif.

Recombinaison : phénomène qui se produit par enjambement des chromosomes homologues lors de la méiose. Chaque chromosome a la possibilité d'échanger une partie d'ADN avec son chromosome homologue. Elle constitue une source de diversité génétique.

Rubisco ou ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase : enzyme clé permettant la fixation du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> dans la biomasse végétale en initiant le cycle de Calvin, en relation avec l'énergie solaire captée par la chlorophylle à l'origine des processus de photosynthèse. Elle représente environ 50 % des protéines solubles dans les feuilles des plantes en C3 et 30 % dans celles en C4.

Sélection génomique : sélection basée sur l'évaluation des valeurs génétiques des candidats à la sélection par « un score moléculaire » calculé d'après leurs génotypes en un très grand nombre de marqueurs de l'ADN. Elle suppose deux étapes, il s'agit, en première étape, d'estimer les effets des marqueurs sur une population de référence génotypée et phénotypée pour les caractères à améliorer. Ensuite, la table des valeurs génotypiques ainsi établie est utilisée pour calculer les valeurs génétiques des candidats au cours des générations suivantes, qui peuvent être seulement génotypés.

SNP ou polymorphisme d'un seul nucléotide : type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases. Les SNP constituent la forme la plus abondante de variations génétique du génome.

Etude d'association pangénomique : ou « Genome wide Association Study, GWAS », analyse de nombreuses variations génétiques chez nombreux individus afin d'étudier leurs corrélations avec les traits phénotypiques.

## INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

Compte tenu de l'accroissement de la population mondiale, qui devrait atteindre 9 milliards de personnes en 2050 (Godfray et *al.*, 2010), la demande en nourriture augmentera de 70 à 100% selon les prédictions (Tilman et *al.*, 2011). Par conséquent, l'agriculture, qui fait déjà face à une forte compétition pour les ressources (terre, eau, énergie), doit relever le grand défi de nourrir cette population à travers l'augmentation de la production. De nombreuses terres agricoles ont été perdues du fait de l'urbanisation ou des conséquences d'une mauvaise gestion (désertification, salinisation, érosion). L'agriculture dépend de nombreux facteurs tels que les conditions climatiques, les maladies, les ravageurs et les éléments nutritifs du sol ou de synthèse (engrais chimiques) et la maîtrise de tous ces facteurs pose des problèmes. Le changement climatique en cours complique encore la situation. Produire plus de nourriture en réduisant les impacts environnementaux négatifs liés à l'agriculture est au cœur des objectifs de l'intensification durable.

L'Afrique Subsaharienne (ASS) représente environ 13% de la population mondiale et ceci devrait passer à 22% en 2050 (OCDE et FAO, 2016). L'agriculture africaine doit nourrir cette population grandissante alors qu'elle connaît un faible développement comparé aux pays où la révolution verte a obtenu d'énormes succès, comme dans les pays asiatiques. Elle est pénalisée à cause de la dégradation des sols et du faible niveau de vie impliquant un faible investissement dans les moyens pour augmenter la production (engrais chimiques, variétés améliorées, pesticides et fongicides). Environ 70% de la population africaine dépend du secteur agricole, que ce soit pour leur emploi ou pour leur subsistance (BAD, 2016). Et malgré ce capital humain, le rendement agricole reste faible, par exemple, le rendement de la culture céréalière n'y est que 1,3 t/ha, représentant le ¼ du rendement obtenu par la Chine. Parmi les cultures céréalières, le riz tient une place importante en Afrique. En ASS, 12 millions de tonnes de riz sont produites alors que 12 millions de tonnes sont importées (FAO, 2016). Le riz est cultivé dans différentes zones écologiques (irrigué, pluvial et dans les mangroves) mais la riziculture pluviale est la plus importante (38%) avec des rendements variant de 0,5 à 2 t/ha (Balasubramanian, 2007). En condition pluviale, le rendement en grains atteint environ 2 t/ha chez les agriculteurs qui font de la rotation du riz avec des légumineuses ou d'autres cultures. Par exemple, en Ouganda, les agriculteurs les plus performants ont des rendements de 2,2 t/ha en utilisant des variétés améliorées (NERICA) et avec de faibles niveaux d'intrants (Kijima et *al.*, 2006). Par contre, des rendements beaucoup plus faibles sont observés dans les conditions d'agriculture de subsistance. Ces dernières se caractérisent par une faible utilisation d'intrants (engrais minéraux, pesticides, herbicides) à cause de leur prix élevé face au manque de moyen financier.

A Madagascar, le riz est la culture la plus importante avec une consommation annuelle très élevée (114 kg/ personne, INSTAT, 2006) par rapport à l'ensemble des pays d'ASS (18 kg/personne, FAO, 2006)

et à la consommation moyenne mondiale (56,5 kg/personne, [http2](#)). Toutefois, la consommation annuelle en riz des Malagasy n'a cessé de diminuer avec 200 kg/personne en 1970, 125 kg/personne en 2000 et 110 kg/personne en 2010 (David-Benz *et al.*, 2010). Ceci résulte de l'augmentation de la demande en riz liée à l'accroissement démographique alors que la production rizicole n'a augmenté que très faiblement. Même si la filière rizicole reste une des grandes priorités de la politique agricole du pays, l'offre est très loin de satisfaire la demande des consommateurs Malagasy. Madagascar exportait du riz, mais depuis le début des années 70, la grande île est devenue importatrice de riz asiatique. La quantité importée varie chaque année selon les besoins et en 2015, 331000 tonnes de riz ont été importées (FAO, 2015). Pour la riziculture, Madagascar possède trois écosystèmes dont le riz irrigué (78,7% de la superficie rizicole), le riz de « Tavy » (12,9%) et le riz pluvial (8,4%) (MAEP, 2007). La riziculture irriguée assure l'essentiel de la production rizicole. Toutefois, les possibilités d'aménagements de nouveaux périmètres irrigués sont limitées. De plus, l'utilisation des engrais chimiques, qui serait une option pour augmenter la production, reste très réduite à cause de leur prix trop élevé pour les paysans (Minten *et al.*, 2007). Dans ce contexte, la riziculture pluviale s'est particulièrement développée dans les zones d'altitude au-dessus de 1300 m grâce au développement de nouvelles variétés tolérantes au froid. Les « tanety » (ou collines) qui étaient auparavant principalement destinées aux autres cultures vivrières comme le maïs, le manioc, la patate douce sont aussi maintenant cultivés avec le riz pluvial d'altitude (Raboin *et al.*, 2013 et 2014). La riziculture pluviale contribue à améliorer la sécurité alimentaire des ménages dans ces zones. Par ailleurs, de très grandes surfaces cultivables sont disponibles dans le Moyen Ouest de Madagascar et propices aux cultures pluviales notamment la riziculture pluviale qui y est pratiquée depuis les années 1960.

L'azote constitue un élément essentiel à la croissance et au développement des cultures, surtout les céréales comme le riz. Son importance dans l'augmentation des rendements explique l'augmentation de la consommation mondiale en engrais azotés de 800%, qui a été constatée de 1960 à 2012 (Wu *et al.*, 2016). Cette utilisation excessive d'engrais azotés conduit à une faible efficacité de son utilisation, 33% seulement pour les céréales (Raun et Johnson, 1999; Tilman *et al.*, 2002). L'azote non utilisé par la plante est en effet perdu dans l'écosystème, entraînant la pollution de la nappe phréatique, la pollution de l'air et l'acidité du sol. Pour augmenter l'efficacité de l'utilisation de l'azote par les cultures, deux stratégies sont possibles, soit par l'optimisation des moyens agronomiques à travers l'amélioration de la pratique culturale (utilisation de la quantité adéquate, l'apport d'azote au moment opportun et le bon placement des engrais azotés dans le sol lors de l'apport) soit par l'utilisation des moyens génétiques à travers l'utilisation de variétés plus efficaces pour l'utilisation de l'azote (Hirel *et al.*, 2007). L'enjeu de l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote est aussi crucial dans les contextes d'agriculture de subsistance ayant très peu de recours aux engrais chimiques. La création de variétés pour ces systèmes à bas niveau d'intrants doit



d'ailleurs être menée spécifiquement de façon à pouvoir identifier des caractères d'adaptation particuliers (Cecarelli, 1996; Murphy *et al.*, 2007). Dans le contexte de forte progression de la riziculture pluviale à Madagascar sur des sols de « tanety » présentant une faible fertilité et une grande fragilité, la problématique est de savoir « comment améliorer la productivité des systèmes de culture de riz pluvial tout en assurant leur durabilité ainsi que leur adaptation et leur insertion dans les systèmes paysans locaux? ». L'amélioration génétique du riz pluvial est un des axes de recherche retenus pour répondre à ces enjeux. Compte tenu de la faible offre en azote des systèmes de culture en riziculture pluviale dans le contexte d'agriculture de subsistance à Madagascar où l'utilisation d'intrants chimiques est limitée, l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du sol est un objectif important. La première question de recherche, un préalable à toute entreprise d'amélioration génétique, est de se demander « quel est le niveau de variabilité génétique qui existe pour l'efficacité de l'utilisation de l'azote chez le riz pluvial et les autres caractères agronomiques qui lui sont liés? ». La seconde question de recherche abordée dans cette thèse est « quelles sont les zones du génome du riz impliquées dans la variation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote? ». L'objectif global de cette étude est donc de contribuer à une meilleure compréhension du déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du riz pluvial et de l'élaboration du rendement en fonction de la nutrition azotée. Les objectifs spécifiques consistent à (i) étudier la variabilité génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote, du rendement en grains et de leurs composantes ainsi que d'autres caractères agronomiques associés et (ii) étudier les bases génétiques de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et de l'ensemble des autres caractères agronomiques associés chez le riz pluvial. Les hypothèses de recherche stipulent que (i) il existe une variabilité génétique pour l'efficacité de l'utilisation de l'azote et pour les autres caractères agronomiques ; (ii) les zones du génome responsables de la variation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote peuvent être étudiées à travers la génétique d'association.

Pour ce faire, la thèse a été divisée en trois chapitres :

- Le premier chapitre est dédié à la synthèse bibliographique autour du contexte de la riziculture à Madagascar, de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la génétique d'association comme méthode d'étude des bases génétiques des caractères complexes tels que l'efficacité de l'utilisation de l'azote.
- Le deuxième chapitre est consacré à l'analyse fine de la variabilité génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote au sein des 13 variétés de riz pluvial. Cette partie a été l'objet d'un article scientifique qui est déjà publié.
- Le troisième chapitre consiste à la dissection phénotypiquement et génotypiquement l'efficacité de l'utilisation de l'azote dans un panel de 198 variétés de riz pluvial par une approche de la génétique d'association. La partie qui décrit les résultats de l'étude d'association pangénomique a aussi été rédigée sous la forme d'un article scientifique.

## Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Le riz à Madagascar

#### I.1. Origine du riz à Madagascar

L'introduction de la culture du riz à Madagascar est liée au peuplement de l'île qui s'étend sur plus de quinze siècles et s'est effectué à l'intérieur d'un espace maritime et commercial austronésien s'étendant jusqu'au Nord-Ouest de l'Océan Indien et à l'Afrique de l'Est (Domenichini-Ramiaramanana et Domenichini, 1983; Domenichini-Ramiaramanana, 1988). Deux périodes se distinguent, celle de l'essartage (depuis l'arrivée des proto-malagasy venus d'Indonésie jusqu'au début du 15<sup>ème</sup> siècle) et celle de la riziculture irriguée (avec de nouvelles vagues d'immigration à partir du 15<sup>ème</sup> siècle). Pendant l'époque de la royauté d'Andrianampoinimerina de 1786 à 1810 (Madagascar étant divisé en plusieurs royaumes), le roi visait l'unification du pays et sa devise était « la mer sera la limite de ma rizière ». La culture du riz se répand dans toute l'île et le riz constitue la base de l'alimentation des Malagasy.

#### I.2. Importance du riz : production et place socio-économique

Le riz occupe une place importante dans la vie sociale, économique et politique de Madagascar. Il est ainsi présent dans les rites heureux ou malheureux de la population. Dans tout le pays, la riziculture offre un paysage exprimant la spécificité de la civilisation du riz à Madagascar. Tous les bas-fonds sont aménagés en rizières. Dans les parties du Centre vers le Sud-Est (Betsileo), les collines sont aussi aménagées en rizières ; il existe de grandes plaines rizicoles (lac Alaotra, Marovoay, plaine de Betsimitatatra ...) et aussi de plus en plus de riz pluvial cultivé sur les collines « riz de tanety » (MAEP, 2004). Les Malagasy sont parmi les plus grands consommateurs de riz dans le monde, ils en consomment trois fois par jour et la consommation annuelle moyenne de riz est environ de 110 kg par personne (Radanielina, 2013).

Le riz est l'essentiel de l'alimentation des Malagasy et par conséquent la riziculture occupe une superficie importante avec 55% des surfaces cultivées. La production nationale de riz paddy est estimée à 4 191 000 tonnes en 2016 (Min Agri, 2016). La riziculture constitue un moteur de développement économique. Selon De San et *al.* (2017), 75% de la population vit en milieu rural et l'essentiel de son activité est la riziculture. Au total, 85% des exploitants agricoles du pays produisent du riz (David-Benz, 2011). La riziculture représente 12% du PIB et 43% du PIB agricole du pays (Min Agri, 2016).

#### I.3. Diversité génétique du riz à Madagascar

Le riz cultivé est arrivé à Madagascar avec les premiers arrivants d'origine indonésienne et l'espèce asiatique *Oryza sativa* est la seule espèce cultivée à Madagascar. Toutefois, d'autres espèces de riz sauvage comme *Oryza longistaminata* et *Oryza punctata* sont présentes dans les régions marécageuses de l'Est, de l'Ouest et du Nord de l'île (Ravaonoro et *al.*, 1999). A l'intérieur de l'espèce cultivée, il existe une grande diversité. La collection nationale recense plus de 4000 variétés locales et 2000 variétés améliorées issues

de la création variétale. Pour les variétés traditionnelles, un travail de distinction à partir de leurs noms vernaculaires a permis à Peltier (1970) de les regrouper en grandes familles telles que Makalioka, Tsipala, Botra, Lava, Vato,... Plus tard, des travaux d'identification morpho-physiologique et moléculaire de ces variétés ont conduit à distinguer deux sous-espèces connues de *Oryza sativa* dont « *Indica* » et « *Japonica* » mais aussi un groupe atypique (Ahmadi et al., 1988) rencontré sur les Hautes Terres, particulièrement dans la région Vakinankaratra jusqu'à 1800m d'altitude. L'existence de ce groupe atypique a été confirmée (Radanielina et al., 2013) avec un habitat préférentiel entre 1250 et 1750 m d'altitude. Ce groupe atypique pourrait être issu d'un effet de fondation à partir des variétés introduites de l'Inde du Sud et du Sri Lanka ou alors de la sélection de descendants issus de croisements entre les sous-espèces *indica* et *japonica* qui se sont adaptés à la région d'altitude.

#### I.4. Différents types de riziculture à Madagascar

La superficie consacrée à la riziculture a été estimée à 1245000 hectares pour la campagne 2004-2005 lors du recensement agricole (MAEP, 2007) et répartie en trois écosystèmes. Ces écosystèmes sont :

- La riziculture irriguée pratiquée dans les bas-fonds et les plaines dont le sol est inondé durant la saison culturale. Elle se rencontre dans toutes les régions et représente 78,7% de la superficie totale. Pour cette riziculture irriguée, il existe trois systèmes de culture en fonction du positionnement de la culture par rapport à la saison des pluies :

(i) Le « vary aloha » ou riz précoce qui n'attend pas la saison de pluie mais dépend de la disponibilité de ressources en eau dans les rizières, le repiquage se fait en septembre, à la fin de la saison froide;

(ii) Le « vary vakiambiaty » qui se pratique pendant la saison des pluies;

(iii) Le riz de contre-saison qui se pratique pendant la saison sèche, après la saison des pluies, dans les rizières avec une bonne ressource en eau.

- La riziculture pluviale (« vary an-tanety ») pratiquée sur le versant ou la partie sommitale des collines (« tanety ») dont l'alimentation en eau est assurée par la pluie. Elle représente 8,4 % de la superficie rizicole totale et se rencontre dans toutes les régions.

- La riziculture de « Tavy » qui est une sorte de riziculture pluviale itinérante sur « abattis-brûlis » et qui consiste à abattre la végétation préexistante puis à la brûler avant d'installer le riz. Ce type de riziculture occupe 12,9 % de la superficie rizicole totale et il se pratique seulement dans le Nord et l'Est du pays.

#### I.5. Le riz pluvial à Madagascar

##### I.5.1 Importance du riz pluvial

La riziculture irriguée ne se développe pas beaucoup à cause de la difficulté de son extension car la plupart des bas-fonds sont déjà aménagés. De plus, avec l'augmentation grandissante de la population, les

terrains près des bas-fonds sont aménagés en zones habitables. Par contre, le riz pluvial offre une alternative pour l'extension de la culture de riz.

Dans la région de Vakinankaratra, le riz pluvial a connu un rapide développement depuis 1995 (Raboin et *al.*, 2013) après la diffusion des variétés tolérantes au froid. Une extension remarquable en termes de superficie et de nombre de pratiquants a été observée. Une enquête a été réalisée auprès de 485 paysans répartis dans 16 villages en 2011-2012 (dont certains avaient été déjà enquêtés en 2005). En 2005, 36% des paysans enquêtés seulement pratiquaient la riziculture pluviale alors que 71% des exploitants la pratiquaient en 2011 (Raboin et *al.*, 2014). Une enquête réalisée en 2015 auprès de 112 exploitants dans ces régions a montré aussi qu'avec le riz pluvial, leur production de riz a augmenté et que le riz pluvial permet de réduire la période de soudure et en particulier permet de réduire leur période d'achat de riz au moment où le riz est le plus cher (Breumier et *al.*, 2018).

### I.5.2. Les contraintes de la riziculture pluviale

Comme toutes les cultures, la riziculture pluviale rencontre des contraintes abiotiques, biotiques ainsi que sociotechniques. Concernant les contraintes abiotiques, pour les régions à haute altitude comme celles du Vakinankaratra, le principal problème est le froid. Si dans les années 80, les premières tentatives des paysans à cultiver du riz pluvial ont échoué, ceci a été résolu à partir de l'année 1995 par la création des variétés tolérantes au froid. Par exemple à 1600 m d'altitude, des températures minimales en dessous de 10°C peuvent être observées et les températures moyennes y sont beaucoup plus basses que dans le Moyen Ouest de Madagascar (Figure 1). Une baisse de température trop forte autour de l'initiation paniculaire du riz peut causer une stérilité des épillets, ce qui pénalise beaucoup le rendement. La faible fertilité du sol constitue aussi une contrainte car les sols de collines sont souvent à faible teneur en éléments minéraux assimilables (Raboin et *al.*, 2013), surtout le phosphore qui est immobilisé (Rabeharisoa, 2004) et cela peut limiter la production du riz pluvial, d'autant plus que les paysans n'ont pas les moyens d'apporter des engrais chimiques pour améliorer la fertilité du sol. Les paysans ont essentiellement recours à des fumiers de parc mais en quantité très limitée aussi, ce qui limite les rendements.

Pour les contraintes biotiques, premièrement, il y a la pyriculariose qui est une maladie causée par le champignon *Magnaporthe oryzae*. Elle est présente à tous les stades de développement du riz et attaque les feuilles et les panicules, et même dans certains cas les racines. Sur les feuilles, la maladie se présente sous forme de lésions fusiformes conduisant au dessèchement des feuilles (Photo 1a). Sur les panicules, la maladie se présente sous forme de nécroses de la tige à la base de la panicule, ce qui conduit au dessèchement de la panicule (Photo 1b). La pyriculariose peut causer 10 à 30% de perte de rendement (Skamnioti et Gurr, 2009) voire 100% pour des variétés très sensibles. Cette maladie représente une menace permanente pour le développement de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres (Raveloson et *al.*, 2016).

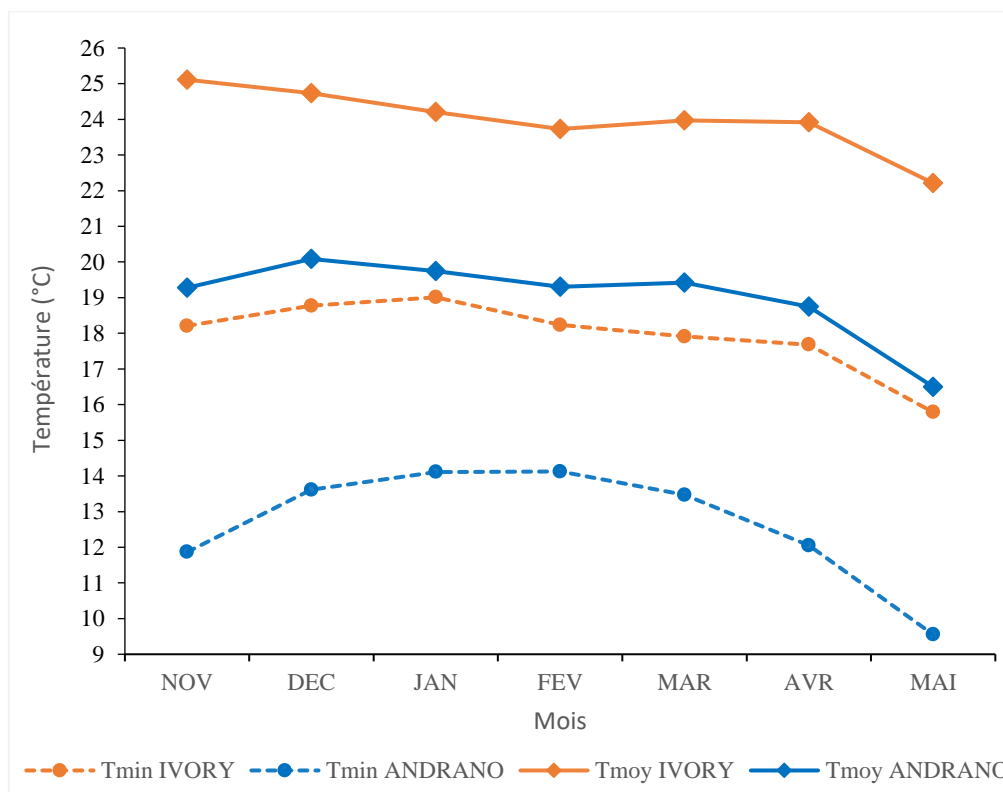


Figure 1: Courbe des températures minimales et moyennes à Ivory et Andranomanelatra de novembre 2010 à mai 2011

Des attaques de la pyriculariose sur les Hautes Terres ont été observées quelques années après le lancement des premières séries de variétés tolérantes au froid qui étaient sensibles à la pyriculariose en 1995, causant une épidémie importante au début des années 2000. Plusieurs voies ont été explorées pour limiter la pression de la pyriculariose sur le riz pluvial et retarder le risque de contournement des résistances des nouvelles variétés. L'effet de la gestion agronomique sur la pyriculariose a été étudié en comparant les systèmes de culture en agriculture de conservation (semis direct sous couverture végétale « SCV ») avec le système conventionnel avec « labour ». Les suivis de la dynamique des épidémies de pyriculariose ont permis de montrer qu'en système traditionnel, l'épidémie évolue plus rapidement dès les premiers signes d'attaque foliaire. A la récolte, le pourcentage de grains vides à cause de la maladie est largement diminué en SCV, notamment à cause d'une assimilation différente de l'azote (Dusserre et *al.*, 2017; Sester et *al.*, 2014). Mais les résultats obtenus concernant les rendements sont moins évidents. De plus, les systèmes préconisant de laisser les pailles de riz sur les parcelles sont peu compatibles avec des mesures de prévention en cas d'apparition de la maladie, car il a été montré que les pailles pouvaient servir de réservoir de spores de pyriculariose jusqu'à 18 mois après la récolte (Raveloson et *al.*, 2017). L'effet des mélanges variétaux a aussi été étudié par Raboin et *al.* (2012), en comparant une culture constituée d'un mélange à deux composantes (une variété très sensible « F154 » et une variété résistante « F172 ») avec une culture pure

de la variété très sensible « F154 ». Le mélange de variétés a permis de réduire significativement la sévérité de la pyriculariose sur la variété sensible.

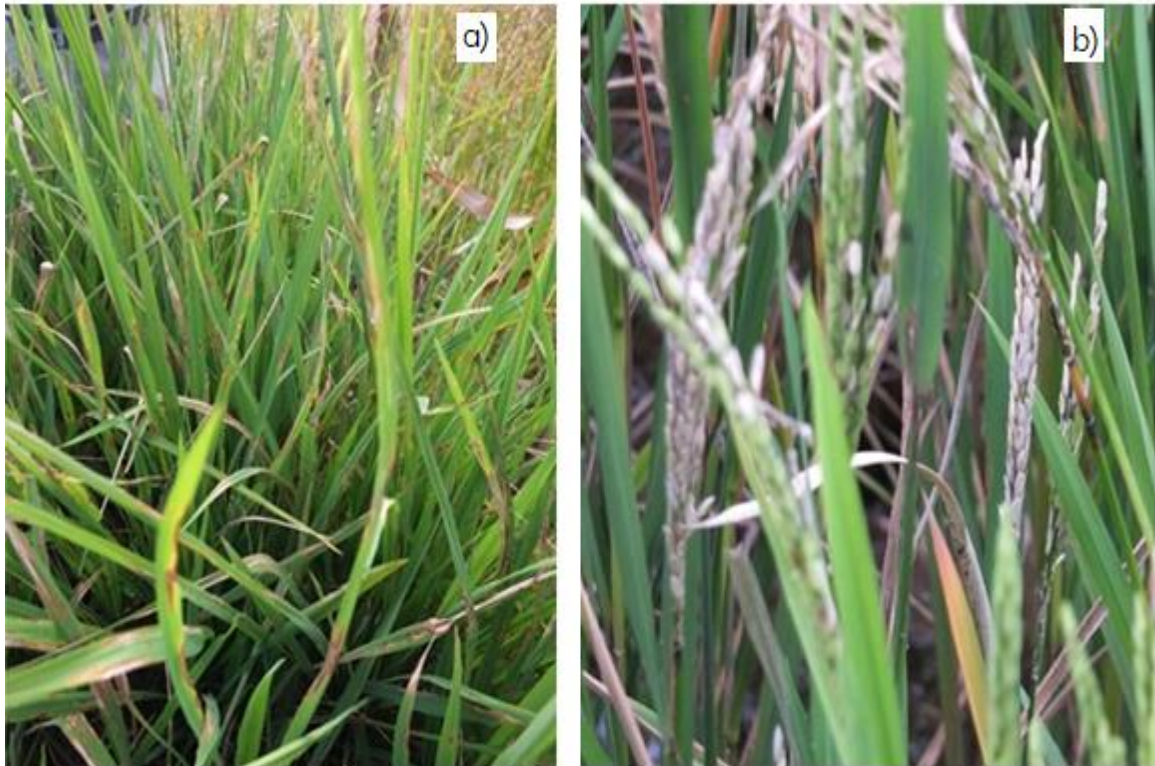


Photo 1: Pyriculariose foliaire (a) et pyriculariose paniculaire (b) sur le riz pluvial  
Source : Raveloson et al., 2016

Deuxièmement, *Striga asiatica* représente une forte contrainte pour la riziculture pluviale de la région de Vakinankaratra. C'est une plante hémiparasite qui se comporte d'abord comme un parasite strict en fixant ses racines sur celles du riz. Il dépend de sa plante hôte pour les sels minéraux, l'eau et les assimilats. Quand il se développe et sort ses feuilles, il devient autonome pour les substances carbonées. *Striga asiatica* cause des dégâts importants (Photo 2) sur le riz pluvial et une forte infestation peut même obliger les paysans à abandonner leurs parcelles. Les moyens de lutte sont basés sur l'utilisation de plantes pièges dans les rotations (qui entraînent la germination « suicide » et la baisse du stock semencier du *Striga*) et le paillage (réduction de la température au sol ce qui réduit la germination du parasite). Ces deux approches peuvent être combinées en agriculture de conservation. Des expérimentations ont été effectuées comparant semis direct sous couverture végétale (SCV) et labour. En SCV, plusieurs espèces de plantes de couverture (*Stylosanthes*, *Brachiaria*, *Cajanus*, *Vigna*, *Arachis repens*) ont été utilisées en association avec

le riz ou avec le maïs précédant le riz, et elles permettent de réduire fortement les infestations par *Striga* (Michellon et al., 2011; Randrianjafizanaka et al., 2018).



Photo 2: Parcelles de riz pluvial infestées par *Striga asiatica*  
Source : Michellon et al., 2011

Troisièmement, les insectes terricoles, communément appelés vers blancs, appartenant à la famille des *Scarabeidae* constituent aussi une contrainte majeure de la riziculture pluviale (Randriamanantsoa et al., 2010). La famille comprend plusieurs espèces et les principaux ravageurs des Hautes Terres appartiennent au genre *Heteronychus sp.* L'adulte attaque les plants à la levée et les touffes se dessèchent par dilacération des tissus au niveau des collets (Pli, 1990). Si l'attaque est sévère, les paysans sont obligés de ressemer. Les larves provoquent ensuite des dégâts pendant toute la durée de la végétation en se nourrissant des racines du riz. Des études concernant l'utilisation des plantes de couverture ont été menées pour rechercher des méthodes alternatives à la lutte chimique afin de réduire les attaques des vers blancs sur le riz pluvial. Les résultats ont montré que (i) certaines plantes de couverture ont des effets directs (toxiques) et d'autres ont des effets indirects (appétence) selon l'espèce et les stades de l'insecte; (ii) *Stylosanthes guianensis*, la crotalaire et le radis fourrager ont des effets négatifs sur les vers blancs ; (iii) certaines espèces ont été trouvées utiles à la culture de riz parce qu'elles aident à améliorer la structure du sol (Randriamanantsoa et al., 2014). Toutefois, les résultats aux champs ne permettent pas encore de conclure à l'efficacité de ces approches.

Des contraintes sociotechniques comme la non-utilisation d'intrants et le faible niveau de vie des paysans limitent le potentiel de la riziculture pluviale. Malgré l'existence de nombreuses variétés à Madagascar, l'utilisation de semences certifiées par les producteurs reste encore faible (Min Agri, 2016) à



cause de leur prix élevé. Les paysans ne disposent pas de capital suffisant pour se procurer de bonnes semences ainsi que des intrants (engrais minéraux, pesticides, herbicides) pour fertiliser et protéger leur riziculture et leur accès aux crédits est limité. Les paysans utilisent essentiellement la fumure organique (fumiers de parc) souvent en quantité insuffisante. La qualité fertilisante des fumiers est aussi très variable mais pourrait être améliorée par de meilleures conditions de stockage avec des effets significatifs sur les rendements de riz pluvial (Rasolofo et *al.*, 2018).

### I.5.3. La sélection variétale du riz pluvial à Madagascar

Un programme de sélection variétale de riz pluvial a été mis en place à la station régionale de recherche du FOFIFA dans la région de Vakinankaratra, en partenariat avec le CIRAD, depuis 1984. L'objectif initial du programme était de créer des variétés de riz pluvial tolérantes au froid. Pour ce faire, le programme consiste à sélectionner des matériels végétaux (des variétés locales et des variétés introduites), faire des croisements en milieu contrôlé et évaluer les lignées sur terrain. Toutes ces procédures durent au minimum sept ans pour un croisement. Entre 20 et 30 croisements par année ont été effectués en serre et les plantes F1 issues de ces croisements sont conduites d'abord en bas-fond (à 1500m d'altitude) (Raboin et *al.*, 2013) puis les générations suivantes, à partir de la F2, sont cultivées sur Tanety, (à 1650m d'altitude). A partir de la quatrième génération, les lignées intéressantes sont évaluées pour leur rendement sous différentes conditions de culture (différents niveaux d'altitude, différents niveaux de fertilisation minéraux) dans des collections testées (jusqu'à 50 variétés sur deux répétitions) et des essais variétaux (8 - 10 variétés sur au moins 4 répétitions). Après ces évaluations, les lignées sont testées à 1800m d'altitude pour confirmer leur tolérance au froid. Ensuite les meilleures lignées sont évaluées dans des essais multilocaux participatifs chez des agriculteurs. Une première série de variétés tolérantes au froid est sortie en 1995 (Figure 2). Ces variétés sont toutes issues du croisement avec des variétés locales malagasys appelées « Latsika » et se sont rapidement révélées sensibles à la pyriculariose. Pour contourner ce problème, un élargissement de la base génétique a été effectué en introduisant des variétés d'origine népalaise (« Jumli Marshi » et « Chhomrong Dhan ») qui ont été utilisées dans les croisements (Figure 2). La sélection s'est fixé comme objectif de combiner la tolérance au froid, la résistance à la pyriculariose, l'adaptation aux conditions bas-intrant et la diversification de la qualité des grains. Depuis 2006, le programme de sélection s'est intéressé aux conditions écologiques du Moyen Ouest. Une seconde station expérimentale a été mise en place à Ivory, à 900 m d'altitude. Les premières variétés créées pour cette localité sont sorties en 2015.

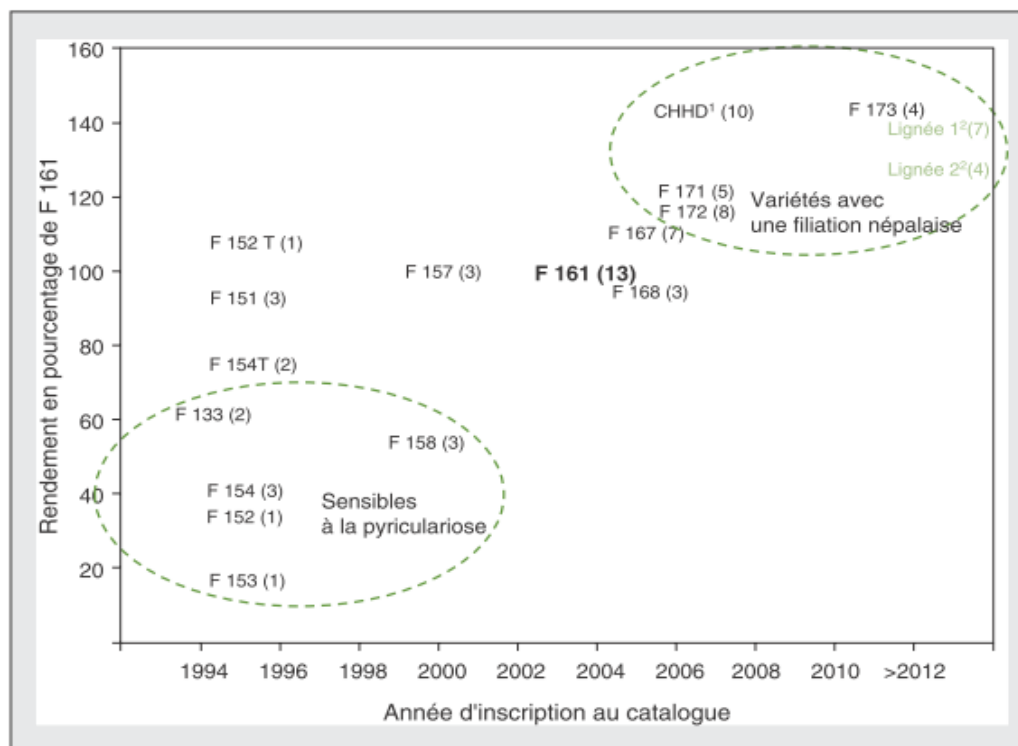


Figure 2: Quelques variétés créées depuis les années 90 jusqu'en 2012 par FOFIFA/CIRAD et comparaison de leur rendement en fonction de l'année de leur première diffusion  
Source : Raboin et *al.*, 2013

## II. Efficience de l'utilisation de l'azote (« Nitrogen Use Efficiency » NUE)

L'azote est un élément essentiel à la croissance et au développement de la plante. Après la deuxième guerre mondiale, des augmentations spectaculaires des rendements de cultures ont été observées grâce à la révolution verte permise par l'utilisation de semences améliorées, de produits phytosanitaires et surtout d'importantes quantités d'engrais chimique (Han et *al.*, 2015). La consommation mondiale en engrais chimiques (Figure 3), notamment azotés a augmenté de 11,4 Mt en 1961 jusqu'à 104 Mt en 2006 ([http1](http://1)). Cette utilisation excessive d'engrais engendre des pollutions de l'environnement à cause de la perte de l'azote par volatilisation et lessivage (Garnett et *al.*, 2009). Selon l'« Intergovernmental Panel on Climate Change » (IPCC, 2007), les engrais seraient responsables de l'émission de 50% des gaz à effet de serre d'origine agricole et les émissions de l'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) en provenance des sols agricoles devraient encore augmenter de 35 à 60% jusqu'en 2030. Cette utilisation excessive d'engrais engendre des réductions de l'efficience de l'utilisation de l'azote (Zhang et *al.*, 2012). Si par exemple, en 1980, avec 1 kg d'azote appliqué, 43 kg de grains ont été obtenus, en 2005, 32 kg de grains seulement ont été récoltés (Sadras et Calderini, 2014), ce qui fait une réduction de l'efficacité de l'utilisation de 24%. Cette faible efficience représente un coût économique important compte tenu du prix des engrais. Pour une moyenne d'efficience de l'utilisation de l'azote des céréales de 33%, l'estimation de la valeur de l'engrais perdu représentait 15 milliards\$ par année en 1999 (Raun et Johnson, 1999). En plus, la fabrication d'engrais consomme

beaucoup d'énergie et le coût de production des engrais augmente en fonction du prix des énergies fossiles. Le prix de plus en plus élevé des engrais sur le marché représente aussi une charge importante pour les agriculteurs compte tenu de l'importance de la quantité apportée. Tous ces aspects ont fait sentir le besoin de réduire les pertes en azote dans les systèmes agricoles conventionnels. Le concept de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (« nitrogen use efficiency », NUE) a commencé à être développé. De ce fait, la sélection de variétés qui valorisent efficacement l'azote du sol est devenue un défi majeur, sachant que l'amélioration génétique des plantes est responsable de l'augmentation de 50 à 60% des rendements et reste un point crucial dans la stratégie d'amélioration de rendement et de l'efficacité de l'utilisation des nutriments (Duvick, 2005). Ce nouveau concept pour l'agriculture vise l'augmentation de rendement tout en réduisant la quantité d'azote appliquée pour minimiser les risques liés à l'environnement et aussi pour une agriculture durable qui assure la sécurité alimentaire.

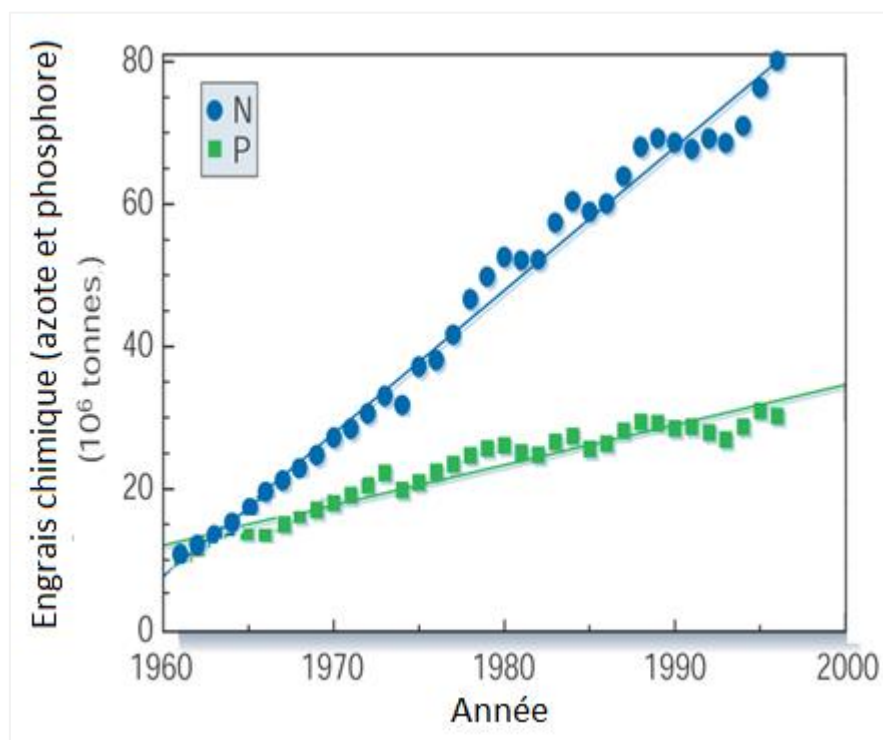


Figure 3: Évolution de la consommation mondiale en engrais azotés (en bleu) et phosphorés (en vert) depuis 1960 jusqu'en 2000  
Source: Tilman et al., 2002

Dans les systèmes à faible intrant ou les systèmes biologiques, l'offre en azote minéral est limitée. La disponibilité et le cycle de l'azote sont différents de ceux du système conventionnel parce qu'ils dépendent de la minéralisation, l'immobilisation et le recyclage de l'azote qui sont stimulés par la température, l'eau et l'activité microbienne du sol. Dans ces systèmes non conventionnels, les déjections animales (principalement fumiers de parc) constituent les sources importantes d'azote mais 50% de l'azote contenu dans ces types de fertilisation sont déjà perdus lors de leur stockage et leur transport et 25% sont perdus après application (Bouldin et al., 1984). La perte de l'azote du sol (par lessivage, par volatilisation,

par exportation par les cultures lors de la récolte) n'est pas compensée par des apports externes d'azote. Par conséquent, le taux d'appauvrissement en azote du sol est environ 30 kgN/ha/an (Liu et *al.*, 2010 b). Le peu d'azote apporté au sol dans ces systèmes doit être utilisé avec le maximum d'efficacité pour assurer le maximum de production. Le concept de l'efficacité de l'utilisation de l'azote constitue aussi un grand défi pour augmenter le rendement dans ces systèmes à faible niveau d'intrants.

### II.1. Définition de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE)

Différentes définitions peuvent être attribuées à l'efficacité de l'utilisation de l'azote (« Nitrogen Use Efficiency », NUE) selon l'objectif poursuivi. Selon Moll et *al.* (1982), le NUE est la masse de grains produite par unité d'azote disponible dans le sol (azote fourni par le sol et azote apporté par l'engrais). Elle peut être divisée en deux composantes : (i) l'efficacité d'absorption de l'azote (« Nitrogen Uptake Efficiency », NUPE) qui est définie comme le rapport entre l'azote absorbé par la plante à maturité et l'azote disponible dans le sol et (ii) l'efficacité de l'utilisation de l'azote (« Nitrogen Utilization Efficiency », NUTE) ou l'efficacité de conversion de l'azote, définie comme le rapport entre le rendement en grain et l'azote absorbé par la plante à maturité. NUPE estime l'efficacité avec laquelle l'azote du sol est absorbé par la plante tandis que NUTE évalue l'efficacité avec laquelle cet azote absorbé par la plante est assimilé et remobilisé vers le grain (Good et *al.*, 2004; Han et *al.*, 2015). Ces composantes sont importantes à évaluer parce que certaines plantes peuvent produire beaucoup de biomasses par unité d'azote mais la conversion de l'azote en grain peut être faible. Le NUE est un caractère complexe qui permet de caractériser et de comparer les différentes variétés (Foulkes et *al.*, 2009) et aussi de différencier la capacité de chaque variété ou chaque espèce à absorber et utiliser l'azote pour produire le maximum de grain (Baligar et *al.*, 2001). Good et *al.* (2004) ont résumé les différentes définitions de NUE selon les auteurs (Tableau1).

### II.2. Efficacité d'absorption de l'azote (« Nitrogen Uptake Efficiency », NUPE)

Le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) sont les principales sources d'azote dans le sol pour la croissance des plantes. Dans les sols aérés, le nitrate est la forme majoritairement absorbée, tandis que dans les sols acides ou imbibés d'eau, l'ammonium représente la principale forme absorbée (Xu et *al.*, 2012). L'entrée de l'azote dans la plante se fait au niveau des racines. L'absorption de l'azote par la plante est un processus complexe faisant intervenir des transporteurs d'azote spécifiques situés dans la membrane plasmique des cellules racinaires (Krapp, 2015). La pluviométrie, la température, le type de sol ainsi que le pH du sol modifient la disponibilité en azote du sol tout au long de son cycle. Les plantes se sont adaptées à cette variabilité en développant différents systèmes racinaires et différents systèmes d'absorption et de transport de l'azote (Wang et *al.*, 2012).

Tableau 1: Différentes définitions de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE)

Caractère	Formule	Abréviation	Définition	Référence	Unité
« Nitrogen Use Efficiency » (NUEg ou NUE grain)	$NUE = Gw / Ns$	Gw : poids du grain Ns : quantité de N fourni (sol + engrais)	Mesure la masse de grains obtenue par unité d'azote dans le sol	Moll et <i>al.</i> (1982)	kg/kg N
« Nitrogen Uptake Efficiency » (NUPE)	$NUPE = Nt / Ns$	Nt : quantité de N totale dans la plante Ns : quantité de N fourni (sol + engrais)	Mesure la fraction de l'azote du sol absorbé par la plante.	Moll et <i>al.</i> (1982)	kgN/kg N
« Nitrogen Utilization Efficiency » (NUTE)	$NUTE = Gw / Nt$	Gw : poids du grain Nt : quantité de N totale dans la plante	Mesure la fraction de l'azote converti en grain.	Moll et <i>al.</i> (1982)	kg/kg N
« Nitrogen Use Efficiency » (NUEb ou NUE biomasse)	$NUE_b = Sw/Nt$	Sw : poids total des biomasses aériennes, Nt : quantité de N totale dans la plante	Mesure l'efficacité de la conversion de l'azote en biomasse.	Le Gouis et <i>al.</i> (2010)	kg/kg N
Efficacité physiologique (Physiological Nitrogen Use Efficiency, PNUE)	$PNUE = GY/Nt$	GY : rendement en grain Nt : quantité de N totale dans la plante	Mesure la capacité de la plante à produire du grain	Piao et <i>al.</i> (2001)	kg/kgN
Facteur de productivité partielle (Partial Productivity Factor, FFP)	$PPF = Y / X$	Y = rendement grain obtenu sur les parcelles fertilisées X = quantité d'engrais azoté apportée.	Représente le rendement grain obtenu pour une quantité donnée d'engrais apporté	Cassman et <i>al.</i> (1996)	kg/kgN
Efficacité agronomique (Agronomic Efficiency of N, AEN)	$AEN = (Y - Y_0) / X$	Y = rendement grain obtenu sur les parcelles fertilisées Y <sub>0</sub> = rendement grain obtenu sur les parcelles non-fertilisées X = quantité d'engrais azoté apportée	Représente l'augmentation du rendement due à l'apport d'azote	Dobermann et Fairhurst, (2000)	kg/kgN
Efficacité de recouvrement (Recovery Efficiency)	$RE = (N_f - N_{nf}) / X$	N <sub>f</sub> = quantité de N absorbé sur les parcelles fertilisées. N <sub>nf</sub> = quantité de N absorbé sur les parcelles non fertilisées. X = quantité d'engrais azoté apportée.	Appelé aussi coefficient apparent d'utilisation : c'est l'augmentation de l'azote dans la plante à maturité due à l'engrais azoté apporté.	Witt et <i>al.</i> (1999)	-

### II.2.1. Influence des caractéristiques racinaires sur NUPE

Les racines sont des organes importants de la plante car elles assurent l'absorption des nutriments et de l'eau, elles sont aussi impliquées dans la synthèse des hormones, des acides organiques et des acides aminés de la plante (Yang et *al.*, 2004). L'architecture du système racinaire des plantes varie d'une espèce à l'autre et à l'intérieur même de chaque espèce selon le génotype et l'environnement où il se trouve (Lynch, 1995). Le système racinaire des céréales comprend plusieurs ordres de racines secondaires qui présentent chacune une capacité d'absorption différente. Ces racines secondaires augmentent la surface d'échange entre le système racinaire et le sol (Morot-Gaudry et *al.*, 2006).

Les sélectionneurs de la révolution verte ont ignoré l'architecture du système racinaire et son implication dans l'augmentation des rendements et n'ont jamais inclus les traits racinaires comme un critère majeur de sélection des variétés (Waines et Ehdaie, 2007). Ce n'est que plus récemment que les chercheurs se sont intéressés au rôle des racines dans l'efficacité d'absorption. Les études sur les racines se multiplient mais les connaissances sur la morphologie racinaire restent limitées à cause de la difficulté de son étude sur le terrain. La majorité des études sur les racines se sont focalisées sur le maïs et le riz (De Dorlodot et *al.*, 2007) qui sont des plantes modèles pour étudier les monocotylédones.

Le système racinaire du riz est caractérisé par un système superficiel et assez peu développé en comparaison avec d'autres espèces de céréales (Fukai et Inthapan, 1988; Kondo et *al.*, 2000). Pour le riz pluvial, la distribution des racines est généralement superficielle comparée à d'autres espèces de cultures pluviales. Le système racinaire du riz présente une large variabilité génotypique (O'Toole et Bland, 1987), qui est spécifique à chaque groupe variétal (*Indica*, *Japonica*, etc) et à chaque écosystème. Par exemple, les variétés du groupe *Indica*, adaptées à la culture irriguée ont tendance à avoir un plus grand nombre de racines fines et superficielles avec une faible proportion biomasse racinaire/biomasse aérienne, tandis que les variétés du groupe *Japonica* tropical qui sont adaptées à la culture pluviale, ont un système racinaire avec un nombre plus faible de racines plus épaisses et plus profondes et une proportion biomasse racinaire/biomasse aérienne plus élevée (Courtois et *al.*, 2013).

De nombreuses études ont établi un lien entre le développement racinaire et l'absorption de l'azote (Smith et De Smet, 2012). Le développement racinaire est affecté par l'état nutritionnel de la plante ainsi que par la disponibilité des nutriments. Les formes et les concentrations en azote du sol régulent le système racinaire, par exemple, l'ammonium stimule l'initiation des racines latérales (Lima et *al.*, 2010) tandis que le nitrate favorise leur élongation (Zhang et Forde, 1998). Le Gouis (2007) a mené une étude sur deux variétés de blé (Arche et Récital) qui ont des tolérances contrastées à la carence azotée et a montré que la variété Arche a une meilleure capacité d'absorption de l'azote en relation avec un plus grand développement du système racinaire en profondeur. Les études sur 6 variétés de maïs hybride à faible et à

fort niveau d'azote (Chen et *al.*, 2013) et sur 2 lignées isogéniques (near-isogenic testcrosses) hybrides de maïs à deux niveaux d'azote (Mu et *al.*, 2015) ont conclu que l'augmentation du système racinaire (poids, densité et longueur) améliore la capacité d'absorption de l'azote et le rendement. Par exemple, Lynch (2013) a montré qu'une racine profonde absorbe efficacement l'azote dans les couches plus profondes du sol chez le maïs. Sur le riz, l'étude menée par Ju et *al.* (2015) sur 4 variétés de riz Japonica à 4 niveaux d'azote (0 à 300kg/ha) a montré que les traits racinaires tels que la biomasse racinaire, la distribution des racines en profondeur, la longueur et la densité des racines contribuent à une forte efficacité de l'absorption de l'azote et aussi à une forte efficacité de la conversion de l'azote. Ces traits racinaires peuvent être utilisés comme critère de sélection pour développer des variétés efficaces en utilisation de l'azote. L'étude menée par Pan et *al.* (2016) sur l'effet de l'ombrage et de l'azote sur la morphologie racinaire de trois variétés de riz a montré que l'accumulation de l'azote dans la plante est corrélée positivement avec la longueur et le volume racinaire.

Une colocalisation entre QTLs<sup>1</sup> de l'absorption de l'azote et de caractéristiques racinaires (diamètre de la racine, racine fine et profonde) a été trouvée sur le maïs par Coque et *al.* (2008), ce qui suggère que la sélection pour des traits racinaires est une façon d'améliorer NUPE<sup>2</sup>. Une analyse QTL réalisée sur une population de 218 lignées recombinantes de maïs à deux niveaux d'azote a montré que 70% des QTLs trouvés sur les 3 paramètres de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE, NUPE, NUTE<sup>3</sup>) ont coïncidé avec les QTLs trouvés sur les traits racinaires (nombre de racines séminales et latérales, longueur de racines primaires et séminales, poids de la racine, ratio racine/tige) (Li et *al.*, 2015a), ce qui établit une relation génétique entre architecture racinaire et efficacité de l'utilisation de l'azote.

## II.2.2. Gènes impliqués dans l'absorption du nitrate

L'absorption du nitrate est assurée par des transporteurs membranaires spécifiques appelés « Nitrate Transporter » (NRT). Si la concentration en nitrate dans le sol est faible (inférieure à 200µM), l'absorption est essentiellement assurée par le système de transport à haute affinité (HATS ou « High Affinity Transporter System »). Si la concentration de nitrate est forte, le système de transport à faible affinité (LATS ou « Low Affinity Transporter System ») entre en jeu (Forde et Clarkson, 1999; Forde, 2000). Pour chacun des systèmes de transport, les formes inductible et constitutive coexistent, c'est-à-dire LATS i, LATS c, HATS i, HATS c et l'expression de ces 4 formes est importante pour une meilleure absorption.

A chaque système de transport correspondent plusieurs gènes codants. Les gènes de la famille NRT1 codent pour les transporteurs à faible affinité avec le nitrate (LATS) et les gènes de la famille NRT2 pour

<sup>1</sup> Locus de caractères quantitatifs

<sup>2</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>3</sup> Efficacité de l'utilisation/conversion de l'azote

les transporteurs à forte affinité avec le nitrate (HATS) (Orsel et *al.*, 2002). Récemment, une nomenclature unifiée a été proposée pour la famille NPF (« nitrate transporter/peptide transporter » ou NRT1/PTR). Dans cette famille de 53 gènes chez *Arabidopsis thaliana*, qui peut aussi transporter des acides aminés, des protéines, des hormones (auxines et acide absicique), seulement deux sont impliqués dans l'acquisition du nitrate du sol (Krapp et *al.*, 2014). En revanche tous les transporteurs de la famille NRT2 isolés chez les plantes supérieures sont des transporteurs de nitrate (Wang et *al.*, 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, au moins 4 des membres de la famille NRT2 sur 7 sont des transporteurs de nitrate à haute affinité localisés dans les racines (Krapp, 2015). La fonction des 4 gènes (NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4 et NRT2.5) dans les racines est connue (Orsel et *al.*, 2002). NRT2.1 s'exprime dans l'épiderme et les cellules corticales des racines matures (Figure 4) et assure l'essentiel du transport de nitrate en conditions de faible concentration en nitrate (Wirth et *al.*, 2007). NRT2.2 contribue plus faiblement. Il existe une interaction entre les gènes NRT2 et une protéine membranaire NAR2 (NRT3; Figure 4) qui est nécessaire pour l'absorption du nitrate. Il existe aussi un troisième type de transporteurs de nitrate appartenant à la famille des canaux chloriques (CLC) (Wang et *al.*, 2012).

Pour le riz, il existe plus de 93 gènes NPF (Tsay et *al.*, 2007; Zhao et *al.*, 2010) mais leur rôle est encore peu connu (Li et *al.*, 2015b) et 5 gènes de la famille NRT2 (Araki et Hasegawa, 2006; Cai et *al.*, 2008). Pour les NPF, Li et *al.* (2015 b) ont étudié la fonction du gène OsNPF2.2 de quatre variétés de riz mutants, ils ont trouvé l'importance de OsNPF2.2 dans l'allocation de nitrate dans la plante et la croissance normale du riz. Ce gène est fortement exprimé dans les panicules, ce qui suggère que OsNPF2.2 contrôle le transport de nitrate vers les épillets. Pour les NRT2, Yan et *al.* (2011) ont étudié l'interaction entre OsNAR2.1 et 3 gènes OsNRT2 d'une variété témoin (Nipponbare) et de mutants (génération T2) de riz, les résultats ont montré que OsNAR2.1 interagit avec OsNRT2.1, OsNRT2.2 et OsNRT2.3a et joue un rôle important permettant à la plante de faire face à la teneur variable de nitrate. L'étude menée par Fan et *al.* (2016) sur huit lignées de riz transgéniques a montré que la surexpression du gène NRT2.3b améliore la croissance, le rendement et le NUE de 40%, et une amélioration de la taille de la panicule a été observée. Chen et *al.* (2016) ont étudié la relation entre l'efficacité agronomique de l'azote et l'expression des gènes NRT2 et NAR2 et ils ont conclu que l'augmentation de l'expression de NRT2.1, qui a comme promoteur le gène NAR2.1, améliore le NUE du riz.



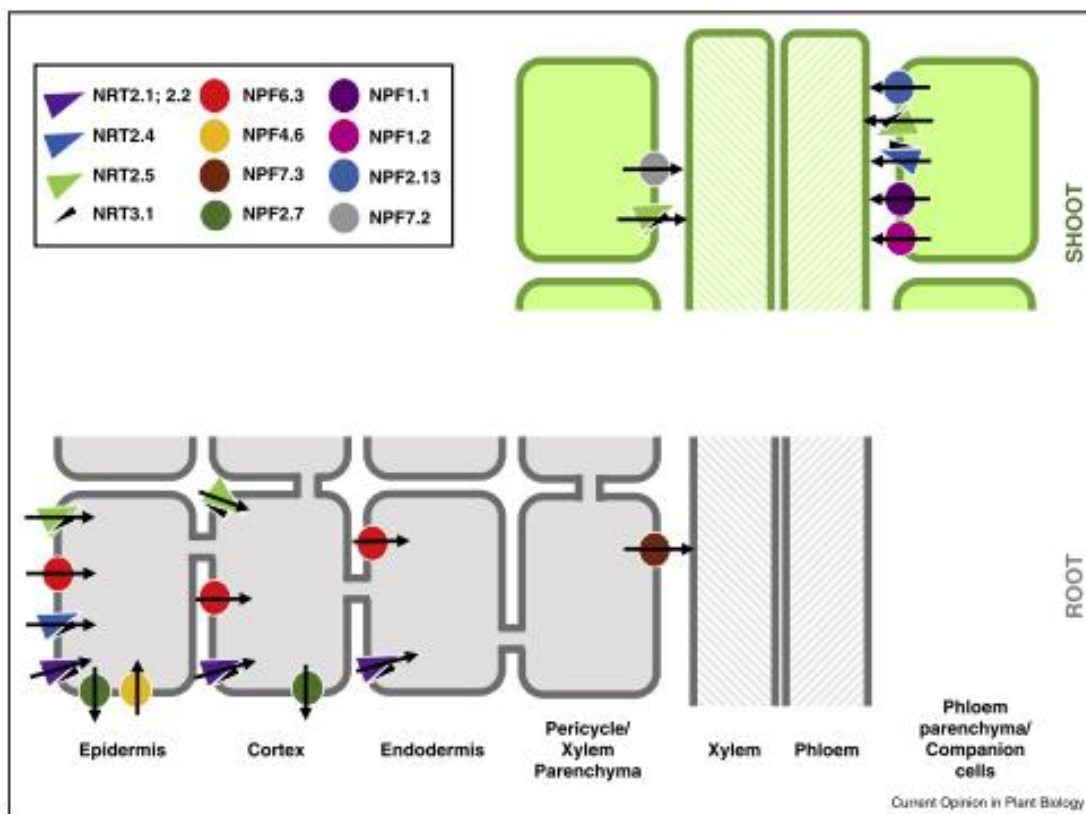


Figure 4: Fonction de nitrate transporter (NRT) d'*Arabidopsis thaliana* dans les cellules de la racine et de la tige

Les membres des familles NRT2, NRT3 et NPF sont impliqués dans l'absorption du nitrate du sol, nitrate exporté de la racine vers le sol et la distribution du nitrate dans la plante.

Source : Krapp, 2015

### II.2.3. Gènes impliqués dans l'absorption de l'ammonium

L'ammonium est la deuxième source d'azote dans le sol, son absorption est assurée par des « Ammonium Transporter (AMT) » grâce à des systèmes à forte et à faible affinité (Wang et *al.*, 1994). Ces deux systèmes sont représentés respectivement par les sous-familles AMT1 et AMT2. Si les plantes peuvent accumuler d'importantes quantités de nitrate, c'est le contraire pour l'ammonium, les plantes ne supportent pas une concentration d'ions ammonium trop élevée à cause de sa toxicité, à l'exception du riz qui est parmi les rares plantes qui peuvent s'adapter à la nutrition ammoniacale (Lea et Azevedo, 2006). Pour *Arabidopsis thaliana*, 6 gènes codent pour des transporteurs d'ammonium (Von wiren et *al.*, 2000). AtAMT1.1, AtAMT1.2, AtAMT1.5 et AtAMT2.1 sont exprimés principalement dans les tiges et les racines, tandis que AtAMT1.3 s'exprime spécifiquement dans les racines et AtAMT1.4 spécifiquement dans le pollen.

Pour le riz, bien que l'ammonium soit la forme principale d'alimentation en azote, l'information reste limitée sur les transporteurs d'ammonium. Douze gènes appartenant à la famille des transporteurs d'ammonium sont répertoriés chez le riz pouvant être rassemblés en 5 groupes (Li et *al.*, 2017). OsAMT1.1 est exprimé dans les racines et les tiges et induit par l'ammonium. OsAMT1.2 est induit par l'ammonium

exclusivement dans les racines et OsAMT1.3 est induit par une déficience en azote dans les racines. L'expression de OsAMT1.1 et OsAMT1.2 dans les racines est positivement corrélée à la glutamine dans les tissus racinaires, ce qui suggère que la glutamine est un régulateur potentiel de OsAMT1 qui est impliqué dans le transport de l'azote dans les racines (Sonoda et al., 2003). OsAMT2.1 est exprimée de façon constitutive dans les tiges et les racines quelle que soit la source d'azote. OsAMT3.1 est faiblement exprimé (Suenaga et al., 2003).

### II.3. Efficience de l'utilisation de l'azote (« Nitrogen Utilization Efficiency », NUTE)

#### II.3.1. Influence des caractéristiques agronomiques sur NUTE

L'efficience de l'utilisation ou conversion de l'azote (NUTE) évalue l'efficience avec laquelle l'azote prélevé par la plante est converti pour former de la biomasse. En d'autres termes, elle évalue la répartition de l'azote vers les organes (feuilles et tiges) lors de la phase végétative et la remobilisation de l'azote de ces organes végétatifs vers le grain lors de la phase reproductive. Pendant ces processus, certains traits ont de l'influence sur NUTE.

Lors de la phase végétative, l'azote absorbé par la plante assure le bon développement de la plante, c'est-à-dire le développement et la croissance de la plante. Cela concerne la mise en place du nombre de talles, du nombre de nœuds, du nombre de feuilles qui constituent les organes sources pour les grains. Les feuilles, pouvant être mesurées par l'indice de surface foliaire (ou « Leaf index area » LAI), sont très importantes pour intercepter la lumière car elles sont le lieu de la photosynthèse mais aussi leur expansion augmente la capacité de stockage de l'azote sous forme de Rubisco.

L'indice de récolte (ou « harvest index » HI) est un caractère qui mesure le pourcentage de grains produit par rapport à la biomasse totale. Plus HI est élevé, meilleure est la production de grains par la plante. Selon Vose (1990), les variétés modernes avec HI élevé sont souvent des variétés plus efficaces en utilisation de nutriments. Selon Bingham et al. (2012), une augmentation de l'indice de récolte améliore le NUTE chez l'orge.

L'amélioration de NUTE peut diminuer la concentration en azote dans la plante (Xu et al., 2012). Plusieurs études ont rapporté une corrélation négative entre NUTE et la concentration en azote dans les grains et pailles (Tirol-padre et al., 1996; Inthapanya et al., 2000; Koutroubas et Ntanos, 2003). Wu et al. (2016) ont mené une étude sur 14 variétés de riz pour identifier les traits qui régissent un fort rendement et une forte NUTE. Ils ont aussi mis en évidence une corrélation négative entre NUTE et la concentration en azote des tiges et des grains à maturité. Ils ont proposé de décomposer la teneur en azote des pailles en teneur en azote des feuilles et des tiges, ce qui a permis de mettre en évidence des relations spécifiques avec le NUTE. Ils proposent donc d'améliorer la translocation de l'azote à partir des tiges plutôt qu'à partir des feuilles pour ralentir la sénescence des feuilles pendant le remplissage des grains.

## II.3.2. Gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote

### II.3.2.1. Réduction du nitrate

Après absorption par les racines, le nitrate peut être soit stocké dans les vacuoles, soit métabolisé directement au niveau des racines et des feuilles (après avoir été transporté vers les parties aériennes). En effet, la réduction du nitrate peut se faire au niveau des racines comme au niveau des parties aériennes. La réduction se fait en deux étapes et se passe dans deux endroits différents. La première étape consiste à la réduction du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) par l'intermédiaire de l'enzyme « Nitrate Réductase (NR) » et se passe dans le cytosol; ensuite le nitrite est importé dans le chloroplaste et réduit en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) à l'aide de l'enzyme « Nitrite Réductase (NiR) » (Meyer et Stitt, 2001; Masclaux-Daubresse et *al.*, 2010) (Figure 5). La Nitrate Réductase est une enzyme clé pour la nutrition azotée de la plante qui est très étudiée. Elle se trouve dans le cytosol des cellules racinaires et foliaires.

### II.3.2.2. Assimilation de l'ammonium

L'ammonium, provenant soit de l'absorption directe du sol, soit de la réduction du nitrate, soit de la photorespiration, soit du recyclage des acides aminés, est assimilé dans le cycle « Glutamine Synthétase (GS)/Glutamate synthase ou glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) » (Figure 5) dans le chloroplaste pour former les premiers acides aminés « Glutamine » (Gln) et « Glutamate » (Glu). L'azote contenu dans le Glutamine et le Glutamate est alors transféré à des acides organiques pour permettre la synthèse d'autres acides aminés (aspartate, alanine, glycine) par des réactions catalysées par différentes autres enzymes de type « Aminotransférase ». Ces acides aminés vont eux-mêmes être précurseurs de tous les autres acides aminés (Lea et Forde, 1994).

Chez les plantes supérieures, deux familles de gènes nucléaires codent pour l'enzyme GS<sup>4</sup>: GLN1<sup>5</sup> et GLN2 (Masclaux-Daubresse et *al.*, 2010). Plusieurs gènes GLN1 codent pour différentes isoformes de GS1 qui sont présentes dans le cytosol des cellules de différents organes comme les racines et les tiges. GLN2, présent comme un gène nucléaire unique chez toutes les espèces étudiées à ce jour, code pour GS2 (qui est dans le chloroplaste) (Hirel et Gadai, 1980; Li *et al.*, 2017). GS1 se trouve dans le cytosol et joue un rôle important dans l'assimilation primaire de  $\text{NH}_4^+$  dans les racines et dans la remobilisation de l'azote (réassimilation de l'ammonium lors du recyclage de protéines dans les feuilles).

---

<sup>4</sup> Glutamine Synthétase

<sup>5</sup> Glutamine

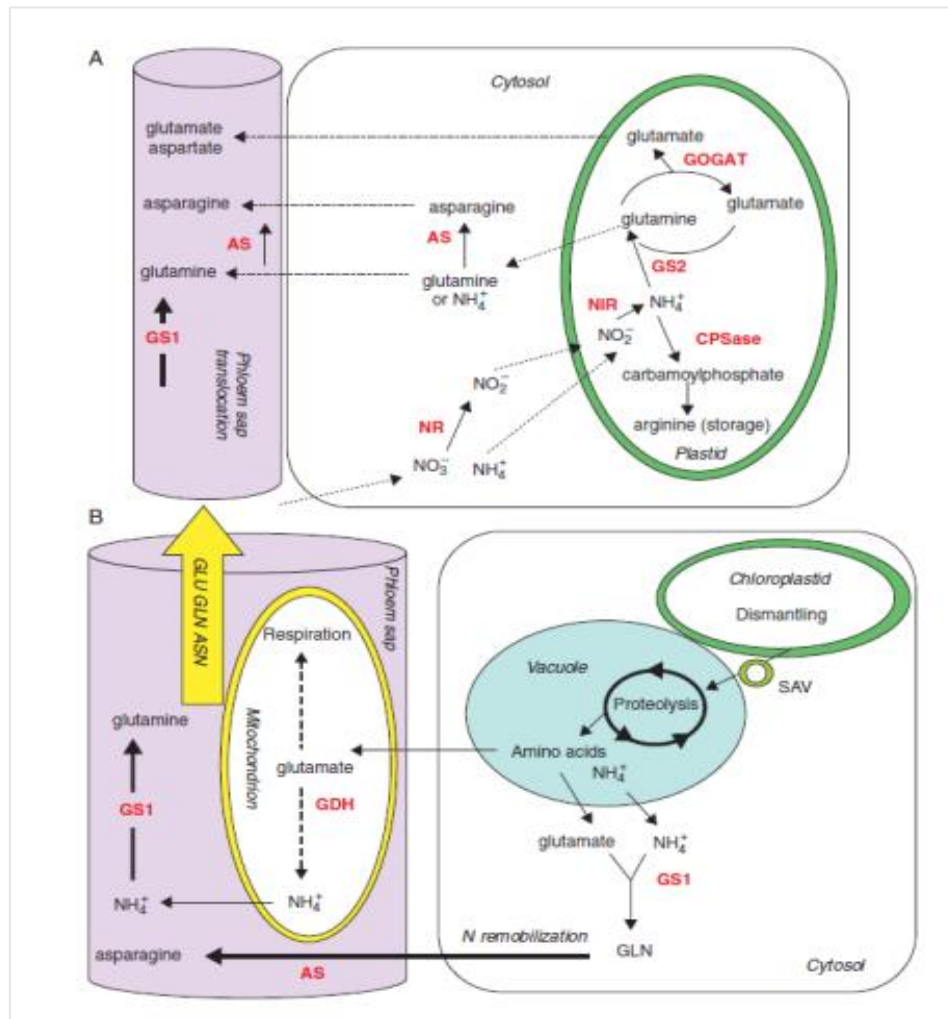


Figure 5: Mécanismes de l'assimilation et de la remobilisation de l'azote dans les jeunes feuilles (A) et dans les feuilles sénescentes (B)

A : Réduction de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) par le nitrate réductase (NR); puis le nitrite en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) par le nitrite réductase (NiR). Intégration de l'ammonium dans des molécules carbonées par le cycle GS/GoGAT pour donner des acides aminés Glutamine et Glutamate. Ces derniers sont transférés dans le phloème pour être transportés vers d'autres organes.

B : Libération de l'ammonium et du glutamate par démantèlement et protéolyse des protéines pour donner de la glutamine à l'aide de GS. Le Glutamine sera remobilisé et transporté vers le phloème. GS1, GDH et ASN1 sont les enzymes impliqués dans la synthèse de Glutamine, Glutamate et Asparagine. GS : Glutamine synthétase ; GOGAT : glutamate synthase; AS : asparagine synthétase; GDH : glutamate déhydrogénase.

Source : Masclaux-Daubresse et al., 2010

Chez *Arabidopsis thaliana*, cinq gènes GS1<sup>6</sup> existent, parmi eux, AtGS1.2 a une fonction dans la réassimilation de l'ammonium lors de la remobilisation de l'azote des organes végétatifs vers les grains (Guan et al., 2014). Quant au GS2, il se trouve dans le chloroplaste et est impliqué dans l'assimilation primaire de l'ammonium. Chez le riz, quatre gènes GS1 et un gène GS2 ont été identifiés, dont l'expression dans les feuilles et les racines varient en présence d'azote (Zhao et Shi, 2006). Les travaux de Tabuchi et

<sup>6</sup> Glutamine Synthétase

*al.* (2005) sur le riz mutant ont montré que GS1.1 est exprimé dans tous les organes et plus particulièrement dans les feuilles, tandis que GS1.2 est exprimé principalement dans les racines et GS1.3 est exprimé dans les épillets. L'étude de mutants d'insertion dans le gène GS1.1 indique le rôle important de GS1.1 dans la croissance et le remplissage de grains qui n'est pas compensé par GS1.2 et GS1.3. Obara et *al.* (2001 ; 2004) ont étudié une lignée quasi isogénique (« near isogenic lines »), issue du croisement entre Kasalath (*indica*) et Koshihikari (*japonica*) (dont le fond génétique présente une substitution d'un segment de 50 cM provenant de Kasalath). L'étude de cette lignée à différents niveaux d'azote a permis de confirmer l'existence d'un QTL sur le chromosome 2 lié au nombre et poids de la panicule et à la teneur en GS1 dans les feuilles particulièrement à faible niveau d'azote.

Concernant le glutamate synthase ou GOGAT, il en existe deux types chez les plantes supérieures qui se distinguent par leur donneur d'électrons ferrédoxine (Fd-GOGAT) ou NADH (NADH-GOGAT). Fd-GOGAT s'exprime dans les chloroplastes des feuilles et joue un rôle important dans le métabolisme azoté photorespiratoire tandis que NADH-GOGAT s'exprime dans les plastes des tissus non chlorophylliens et joue un rôle dans l'assimilation de l'ammonium dans les racines. Chez le riz, un gène code pour le Fd-GOGAT et deux gènes codent pour le NADH-GOGAT (Tabuchi et *al.*, 2007). NADH-GOGAT1 s'exprime dans de nombreux tissus (principalement dans les racines, les tiges et les anthères). NADH-GOGAT2 s'exprime dans les tissus vasculaires des feuilles matures. La mutation de NADH-GOGAT2 cause une réduction marquée du nombre d'épillets et de la productivité suggérant son implication dans la remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains au cours de la sénescence (Tamura et *al.*, 2011). Des lignées de riz transgéniques surproduisant le NADH-GOGAT ont montré une augmentation jusqu'à 80% du poids des grains, ce qui montre que NADH-GOGAT est une enzyme clé pour l'utilisation de l'azote et le remplissage des grains (Yamaya et *al.*, 2002).

L'asparagine synthétase (AS) (Figure 5) est aussi une enzyme impliquée dans l'assimilation de l'ammonium. Le transfert d'un groupe aminé de la glutamine à l'asparagine est catalysé par l'asparagine synthétase. Chez *Arabidopsis thaliana*, trois gènes codent pour AS (AtASN1, AtASN2 et AtASN3) dont ASN2 qui est essentielle à l'assimilation, la distribution et la remobilisation de l'azote (Gaufichon et *al.*, 2013). L'asparagine qui présente un N/C plus élevé que la glutamine constitue la molécule de transport de l'azote à longue distance des organes végétatifs vers les organes reproductifs (Lea et *al.*, 2007). Ohashi et *al.* (2015) ont identifié deux gènes qui codent pour Asparagine synthétase chez le riz (OsAS1 et OsAS2). OsAS1 est exprimé principalement dans les racines tandis qu'OsAS2 s'exprime dans les feuilles et dans les gaines foliaires. L'étude de mutants éteints pour AS1 qui présente une réduction de 80% de la teneur en asparagine dans les racines démontre le rôle d'AS1 dans la synthèse d'asparagine et dans l'assimilation

primaire de l'ammonium dans les racines. AS1 s'exprime principalement dans deux couches de cellules racinaires (épiderme, l'exoderme).

La Glutamate Déhydrogénase (GDH) est une enzyme catalysant la désamination réversible du L-glutamate en 2-oxoglutarate ou l' $\alpha$ -cétoglutarate (Forde et Lea, 2007) et joue un rôle dans le métabolisme du carbone et de l'azote. Deux gènes codent pour GDH<sup>7</sup> dont 1 dépend de NADH et se trouve dans les mitochondries et l'autre dépend du NADPH et se trouve dans les chloroplastes. Cette enzyme est présente dans les mitochondries de différents organes de la plante (Dubois et *al.*, 2003). Sur le maïs, Lightfoot et *al.* (2007) ont étudié la tolérance à la sécheresse de lignées de maïs transgéniques. Ils ont identifié que les lignées transgéniques surexprimant le NADPH-GDH ont vu leur rendement augmenter en cas de fort déficit hydrique, ce qui suggère que GDH pourrait améliorer la tolérance au stress hydrique. Qiu et *al.* (2009) ont étudié la famille des gènes glutamate déhydrogénase chez le riz. Ils ont identifié quatre gènes putatifs de GDH, qui sont exprimés dans différents organes de la plante. Ils se classent en deux types: OsGDH1, OsGDH2, OsGDH3 dans le type II et OsGDH4 dans le type I. OsGDH1, deux et quatre sont exprimés dans différents tissus mais OsGDH3 est exprimé spécifiquement dans les glumes et les étamines. L'expression différentielle des gènes OsGDH dans des conditions limitantes en N et P suggère le rôle de ces gènes dans la tolérance à ces conditions.

La Carbamoylphosphate synthase (CPSase) constitue aussi une enzyme intervenant dans l'assimilation de l'ammonium (Figure 5). Elle s'exprime dans les chloroplastes des feuilles. En utilisant le bicarbonate, l'ATP<sup>8</sup> et l'ammonium, il forme le carbamoylphosphate qui est un précurseur de citrulline et d'arginine dans les chloroplastes (Masclaux-Daubresse et *al.*, 2010).

### II.3.3. Gènes impliqués dans la remobilisation de l'azote

Après la floraison, l'azote est accumulé dans le grain de deux façons, par absorption et par remobilisation, c'est-à-dire transfert de l'azote des organes végétatifs vers les organes reproductifs. La remobilisation est un processus complexe qui implique de nombreuses voies et régulations métaboliques. Cette complexité vient de l'expression de nombreux gènes et des contraintes environnementales (stress hydrique, stress thermique). Après la formation du grain, dont le développement nécessite un apport de composés carbonés et azotés, la remobilisation commence. La remobilisation de l'azote constitue une étape très importante car 70 à 90% de l'azote total de la panicule du riz est remobilisé via le phloème à partir des organes sénescents (Tabuchi et *al.*, 2007). Pour la sous-espèce *japonica*, 80% de l'azote du grain provient de la remobilisation (Mae et Ohira, 1981). Selon les conditions pédoclimatiques et les différentes variétés, une proportion variable de l'azote des grains provient de la remobilisation de l'azote.

<sup>7</sup> Glutamate Déhydrogénase

<sup>8</sup> Adénosine Triphosphate

Les protéines, contenues dans les chloroplastes des feuilles, se dégradent puis se remobilisent sous forme d'acides aminés vers le grain, la Rubisco en est la principale source. Mae *et al.* (1983) et Sage *et al.* (1987) ont montré que la Rubisco représente 50% des protéines solubles totales dans les feuilles des plantes C3 et 20% de celles des plantes C4. Ce processus de dégradation se traduit par la sénescence complète de l'ensemble de l'appareil végétatif et l'arrêt de la photosynthèse. Plus la sénescence des feuilles est accélérée, meilleure est la remobilisation des éléments minéraux. L'amélioration de l'efficacité de remobilisation de l'azote permettrait d'améliorer significativement l'utilisation de l'azote. Sur le blé, une étude faite par Uauy *et al.* (2006) sur un croisement entre blé dur sauvage et blé dur cultivé a permis d'identifier le gène NAM-B1, situé sur le bras court du chromosome 6B, qui augmente la remobilisation de l'azote et d'autres éléments minéraux comme le zinc et le fer, conduisant à une meilleure allocation de ces éléments dans le grain à maturité. Un grand nombre de gènes codant pour des protéases, différentes isoformes de GS1, GDH et AS sont activés pendant la remobilisation de l'azote (Masclaux Daubresse *et al.*, 2010).

## II.4. Amélioration génétique de l'efficience de l'utilisation de l'azote NUE

### II.4.1. Variabilité génétique de l'efficience de l'utilisation de l'azote

De nombreuses études ont montré qu'il existe une variabilité génétique pour NUE et ses composantes, sur le blé (Dhugga et Waines, 1989; Le Gouis *et al.*, 2000; Barraclough *et al.*, 2010; Gaju *et al.*, 2011), sur le maïs (Bertin et Gallais, 2000; Gallais et Coque, 2005) et sur le riz (DeDatta *et al.*, 1988; De Datta et Broadbent, 1993; Tirol-Padre *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998; Inthapanya *et al.*, 2000; Koutroubas et Ntanos, 2003; Wei *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016).

Les études qui considèrent différents niveaux d'azote permettent d'évaluer le niveau d'interaction génotype  $\times$  azote pour le NUE. Elles montrent souvent un niveau significatif d'interaction génotype  $\times$  azote, par exemple sur le blé (Le Gouis *et al.*, 2000), sur le maïs (Gallais et Coque, 2005) ou sur le riz (Ju *et al.*, 2015). Mais cette interaction est souvent relativement faible au regard des corrélations fortes qui sont observées pour les rendements obtenus entre niveaux forts et faibles d'azote apporté (Gallais et Coque, 2005). D'ailleurs, le progrès génétique réalisé pour le NUE s'est révélé positif et très similaire que ce soit à fort ou à faible niveau d'apport d'azote pour des variétés de blé inscrites sur une période de 25 ans (Cormier *et al.*, 2013).

Chaque composante de NUE<sup>9</sup> aussi a été évaluée pour quantifier son importance et sa contribution dans différentes conditions azotées du milieu. Van Sanford et Mackown (1986), dans leur étude sur 25 variétés de blé, ont montré que 60 à 80% de la variation pour le NUE sont expliqués par NUPE<sup>10</sup>. Par contre,

<sup>9</sup> Efficience de l'utilisation de l'azote

<sup>10</sup> Efficience de l'absorption de l'azote

Bingham *et al.* (2012), en faisant une analyse rétrospective du NUE sur l'orge, ont observé que 60% de la variation du NUE sont expliqués par NUTE<sup>11</sup> et 40% seulement sont expliquées par NUPE. De la même façon, Barraclough *et al.* (2010) ont étudié 39 variétés de blé à 5 niveaux d'azote et ont trouvé que NUTE expliquait mieux la variation de NUE que NUPE quel que soit le niveau d'azote. Sur le blé, Le Gouis *et al.* (2000) ont montré qu'à faible niveau d'azote, NUPE explique 64% de la variation de NUE alors qu'à fort niveau d'azote, c'est le NUTE qui explique 69% de la variation du NUE. Inversement, chez le maïs, la variation de NUE était mieux expliquée par NUPE à fort niveau d'azote tandis qu'à faible niveau d'azote, les deux composantes NUPE et NUTE jouent un rôle important (Gallais et Coque, 2005).

Afin de développer des variétés à meilleure NUE, les études ne se limitent pas aux composantes de NUE mais aussi à leurs relations avec les traits agronomiques. Sur l'orge, une analyse rétrospective d'environ 75 années d'amélioration de NUE a été effectuée par Bingham *et al.* 2012. Ils ont identifié que l'augmentation de l'indice de récolte améliore NUTE quel que soit l'environnement; et que NUE est corrélé positivement avec l'azote absorbé postfloraison et la quantité de biomasse postfloraison. Sur le blé, Barraclough *et al.* (2010) ont étudié 39 variétés et ont identifié que quatre caractères agronomiques tels que le rendement en grain, la teneur en azote dans les grains, la quantité d'azote totale absorbée par la plante et l'indice de récolte azoté, constituent les variables clés déterminant le NUE. Une relation négative entre teneur en azote dans les grains et les pailles et le NUE a été constatée. Sur le riz, Inthapanya *et al.* (2000) a étudié 60 variétés à deux niveaux d'azote et trois localités, ils ont identifié que pour deux de ces trois localités, NUE est négativement corrélé à la teneur en azote dans les grains.

#### II.4.2. Déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote

L'amélioration génétique est responsable de 50 à 60% de l'augmentation de rendement des cultures et continue à être une stratégie essentielle pour l'amélioration des rendements et de l'efficacité de l'utilisation des intrants, dont l'azote en particulier (Han *et al.*, 2015). De nombreuses études de cartographies de QTLs ont été réalisées pour mieux comprendre l'architecture génétique du NUE qui est un caractère quantitatif et complexe et pour tenter d'identifier et d'utiliser des allèles favorables utilisables dans les programmes de sélection.

Sur le maïs, l'étude de Bertin et Gallais (2000) utilisant 99 lignées recombinantes de maïs testées à deux niveaux a montré clairement que les QTLs<sup>12</sup> détectés à haut niveau d'azote étaient différents de ceux détectés à faible niveau d'azote. A faible niveau d'azote, les QTLs détectés sont plus liés aux teneurs en N de la plante et en N remobilisé alors qu'à fort niveau d'azote, les QTLs sont plus liés à l'absorption post floraison. En condition limitante en azote, des QTLs d'utilisation de l'azote ont été détectés alors

<sup>11</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

<sup>12</sup> Locus de caractères quantitatifs



qu'en condition non limitante en azote, ce sont des QTLs d'absorption de l'azote qui sont détectés. En utilisant 99 lignées recombinantes de maïs croisées avec un testeur et évaluées à deux niveaux d'azote, Gallais et Hirel (2004) ont étudié le NUE au niveau hybride. Les caractères physiologiques pour lesquels des QTLs ont été détectés, sont majoritairement ceux de l'assimilation de l'azote (comme les teneurs en nitrate, les activités enzymatiques GS<sup>13</sup>, GD<sup>14</sup> et NR<sup>15</sup>) et de l'efficacité de l'utilisation de l'azote. Des coïncidences entre QTLs de rendement, QTLs de remobilisation de l'azote, QTLs d'activité enzymatique GS et certains gènes codant pour des GS cytosolique ont été identifiées, ce qui suggère le rôle de ces enzymes dans la remobilisation et la translocation de l'N au cours du remplissage du grain. L'étude de 114 RILs<sup>16</sup> de maïs en 2003 puis de 218 RILs l'année suivante pour leur valeur en tant que lignée ou leur valeur en test cross par Coque et *al.* (2008) a identifié 608 QTLs regroupés en 72 clusters. Un effet négatif de la sénescence sur NUPE<sup>17</sup> et sur le nombre de grains a été observé. Des coïncidences ont été trouvées entre QTLs de NUPE, d'architecture racinaire et de staygreen. Les QTLs de remobilisation de l'azote coïncidaient avec les QTLs de sénescence dans les mêmes clusters.

Sur le riz, Shan et *al.* (2005), en étudiant des lignées recombinantes de riz ont identifié un QTL pour NUE biomasse (NUEb) sur le chromosome 6, comptant pour 12.9% de la variation phénotypique. Cho et *al.* (2007) ont étudié 166 RILs de riz à deux niveaux d'azote afin d'identifier les QTLs des traits liés à l'efficacité de l'utilisation de l'azote. Ils ont identifié un seul QTL pour le NUTE<sup>18</sup> sur le chromosome 9 expliquant 15,3 % de la variation phénotypique et celui-ci a été détecté à faible niveau d'azote. Il co-localisait avec un QTL pour la teneur en azote de la paille. Senthilvel et *al.* (2008) ont essayé de quantifier l'interaction génotype × niveau d'azote ainsi que de cartographier les QTLs associés à l'efficacité de l'utilisation de l'azote et les caractères agronomiques associés chez le riz. Ils ont évalué 82 lignées haploïdes doublées, issues du croisement entre IR64 et Azucena à trois niveaux d'azote (0, 100 et 200kg N/ha). 16 QTLs<sup>19</sup> ont été identifiés au total et 11 d'entre eux ont montré une interaction significative avec le niveau d'azote. Sept QTLs associés à l'efficacité de l'utilisation de l'azote, au rendement et ses composantes ont été détectés sur le chromosome 3. Wei et *al.* (2011) ont utilisé 127 RILs<sup>20</sup> à 2 niveaux d'azote pour identifier les QTLs de NUTE<sup>21</sup> du riz et de la tolérance à la déficience en azote. Pour NUTE, 10 QTLs ont été détectés sur les chromosomes 1, 2, 6, 7 et 11. Pour le rendement en grain, 14 QTLs ont été détectés sur les

---

<sup>13</sup> Glutamine Synthétase

<sup>14</sup> Glutamate Déhydrogénase

<sup>15</sup> Nitrate Réductase

<sup>16</sup> Recombinant Inbred Lines

<sup>17</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>18</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

<sup>19</sup> Locus de caractère quantitatif

<sup>20</sup> Recombinant Inbred Lines

<sup>21</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

chromosomes 1, 2, 7 et 11. Des colocalisations entre les QTLs du rendement en grain et QTLs de NUTE ont été trouvées dans 4 régions chromosomiques. Poursuivant ces études sur ces mêmes 127 RILs, Wei et al. (2012) ont évalué le NUE et la tolérance à la déficience en azote du riz, ils ont identifié 4 régions chromosomiques contenant des QTLs de NUE et de la tolérance à la déficience en azote et que ces deux traits sont négativement corrélés. Feng et al. (2015) ont étudié 138 RILs testées à deux niveaux d'azote (faible et normal) pour identifier les QTLs de rendement et de ses composantes. Ils ont mis en évidence 11 QTLs détectés simultanément dans les 2 niveaux d'azote, mais aussi 30 autres QTLs détectés spécifiquement dans chacun des 2 deux niveaux d'azote, ce qui montre que les gènes contrôlant la croissance du riz sont différents à différents niveaux d'azote. Dai et al. (2015) ont évalué 281 RILs, issues de 2 parents qui présentent des différences remarquables pour NUPE et NUTE, pour cartographier les QTLs de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du riz à 3 niveaux d'azote. A la dose plus faible d'azote (0 kg/ha), 2 QTLs pour l'efficacité physiologique de l'utilisation de l'azote (PNUE) ont été détectés sur les chromosomes 3 et 4. Ces QTLs nommés respectivement qPNUE3 et qPNUE4 sont responsables de 11% de la variation phénotypique de PNUE. A dose moyenne d'azote, des QTLs de l'efficacité agronomique de l'utilisation de l'azote (ANUE) sur le chromosome 4 et des QTLs de l'efficacité d'absorption de l'azote sur le chromosome 4, 5, 8 et 9 ont été trouvés, ceux-ci comptaient pour 20,3% de la variation phénotypique. Nguyen et al. (2016) ont étudié 169 lignées recombinantes (RILs) issues d'un croisement de IR64 (*ssp indica*) et Azucena (*ssp japonica*), cultivées dans différentes conditions azotées. Ils ont trouvé huit QTLs sur les chromosomes 1, 2, 3 et 5 pour les paramètres de l'efficacité de l'utilisation de l'azote mesurés et 36 QTLs sur les chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et 12 pour les caractères liés à l'azote.

### III. Génétique d'association pour étudier les bases génétiques des caractères complexes

La génétique d'association appelée aussi « Association study » ou « Association mapping » ou « Linkage disequilibrium mapping », est une méthode de détection des effets des gènes basée sur le déséquilibre de liaison (DL). Développée au début des années 1990 pour des recherches médicales afin d'identifier les zones du génome impliquées dans le contrôle des maladies génétiques sur des caractères qualitatifs (malade/sain : case/control study), cette méthode a ensuite été utilisée dans le domaine de la génétique végétale et étendue à l'étude de caractères quantitatifs (Rafalski, 2002). Comme son nom l'indique, il s'agit d'associer statistiquement les variations phénotypiques aux variations du génome, en d'autres termes, rechercher une association entre un polymorphisme génétique et une variation phénotypique. Cette association doit être causée par une liaison génétique entre le locus marqueur polymorphe et l'un des gènes gouvernant le caractère d'intérêt.

La génétique d'association permet de travailler sur des populations qui ont des diversités alléliques larges par rapport aux populations classiques obtenues après croisement de deux parents (Figure 6). Dans

ce cas, les individus sont peu apparentés et un plus grand nombre d'évènements de recombinaison ont été accumulés depuis les ancêtres communs ou fondateurs, ce qui permet de cartographier les allèles impliqués dans la variation phénotypique avec une résolution plus grande par rapport aux études de QTL<sup>22</sup> conventionnelles (Flint-Garcia et *al.*, 2003; Zhu et *al.*, 2008; Figure 6). Les études d'association reposent sur l'existence d'un déséquilibre de liaison (DL) entre les marqueurs génétiques et le polymorphisme des caractères phénotypiques étudiés. La puissance et la précision de la cartographie dépendent du niveau de DL dans la population et de la taille de la population.

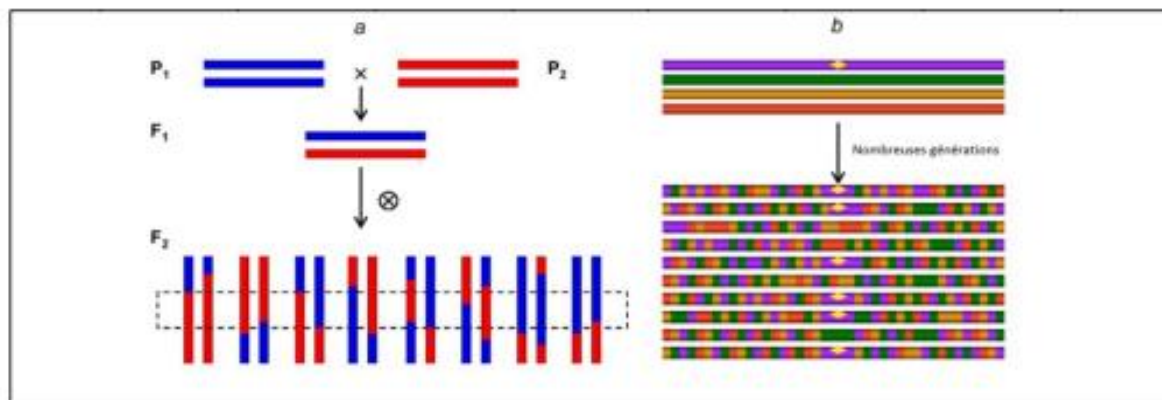


Figure 6: Comparaison entre détection de QTL dans une population en ségrégation (a) et détection d'association dans un panel (b)

L'analyse de liaison (a) utilise des populations en F2 avec de faibles opportunités de recombinaison et offre une résolution de cartographie faible, tandis que dans l'analyse d'association (b), le panel repose sur une large diversité allélique et une accumulation de nombreuses recombinaisons issues de plusieurs générations permettant une cartographie de résolution plus fine.

Source : Zhu et *al.*, 2008

### III.1. Déséquilibre de liaison

#### III.1.1. Définition et mesure

Le déséquilibre de liaison (DL) est l'association non aléatoire entre deux allèles à deux locus dans une population. Plus deux locus sont proches, moins leurs allèles ont de chance d'être transmis de façon indépendante, ils sont alors en déséquilibre de liaison. Il existe plusieurs mesures pour déterminer le DL telles le coefficient de déséquilibre (D) et le coefficient de corrélation allélique ( $r^2$ ) entre deux locus. Le coefficient de déséquilibre de liaison mesure la force du DL entre deux locus. Soit deux locus ayant chacun deux allèles A et a et B et b. Le coefficient de déséquilibre de liaison entre ces deux locus, c'est l'écart «  $D_{ab}$  » entre la fréquence observée d'une association des allèles A et B aux deux locus (Flint-Garcia et *al.*, 2003) et le produit des fréquences attendues de chaque allèle dans la population. Ci-après la formule :

<sup>22</sup> Locus de caractères quantitatifs

$$D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$$

où  $p_{AB}$  : fréquence de l'haplotype AB.

$p_A$  : fréquence de l'allèle A dans la population.

$p_B$  : fréquence de l'allèle B dans la population.

Ainsi, plus  $D_{AB}$  est élevé, plus les locus sont en déséquilibre de liaison. Si  $D=0$ , il y a équilibre de liaison.

D'autres mesures du DL ont été proposées comme le coefficient de corrélation allélique  $r^2$  (Hill et Robertson, 1968). Pour des locus bi-alléliques :

$$r^2(p_A, p_B, p_{AB}) = \frac{D^2}{p_A(1-p_A)p_B(1-p_B)}$$

$p_{AB}$  : fréquence de l'haplotype AB.

$p_A$ : fréquence de l'allèle A.  $p_B$  : fréquence de l'allèle B.

Les valeurs de  $r^2$  sont comprises entre 0 et 1 et très dépendantes des fréquences alléliques.  $r^2$  prend la valeur de 1 si chaque allèle du premier locus est associé à un allèle unique au second locus (déséquilibre de liaison complet). Pour des locus multi-alléliques :

$$r^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{D_{ij}^2}{p_i q_j}$$

où I et J représente le nombre d'allèles respectifs des locus A et B.

La valeur du déséquilibre de liaison dépend en partie de la fréquence des allèles. Pour essayer d'avoir des mesures indépendantes de ces fréquences, une normalisation du coefficient de déséquilibre de liaison (D), notée  $D'$ , a été proposée par Lewontin (1964) pour avoir des valeurs comprises entre -1 et 1.

$$D' = \frac{D}{D_{\max}} \text{ avec } D_{\max} = \begin{cases} \min(p_A p_B; p_A p_B) & \text{si } D > 0 \\ \min(p_a p_b; p_A p_B) & \text{si } D < 0 \end{cases}$$

$D'$  prend les valeurs -1 et 1 lorsque les deux allèles n'ont pas été séparés au cours de l'histoire de la population.

### III.1.2. Étendue du déséquilibre de liaison

Le DL<sup>23</sup> est affecté par la recombinaison pendant la méiose et diminue proportionnellement à la distance séparant les locus. Il diminue d'une génération à l'autre à cause de cette recombinaison (« crossing-over ») (Figure 7), et cette évolution dépend du régime de reproduction des espèces considérées. Si  $r_c$  est la fréquence des recombinaisons entre les deux locus considérés, on obtient la valeur de D à la génération n en fonction de celle à la génération 0 (génération initiale), par la formule suivante :

<sup>23</sup> Déséquilibre de liaison

$$D_n = (1 - rc)^n D_0$$

Le déséquilibre de liaison dépend à la fois du nombre de générations écoulées depuis la mutation initiale et du taux de recombinaison entre les deux locus.

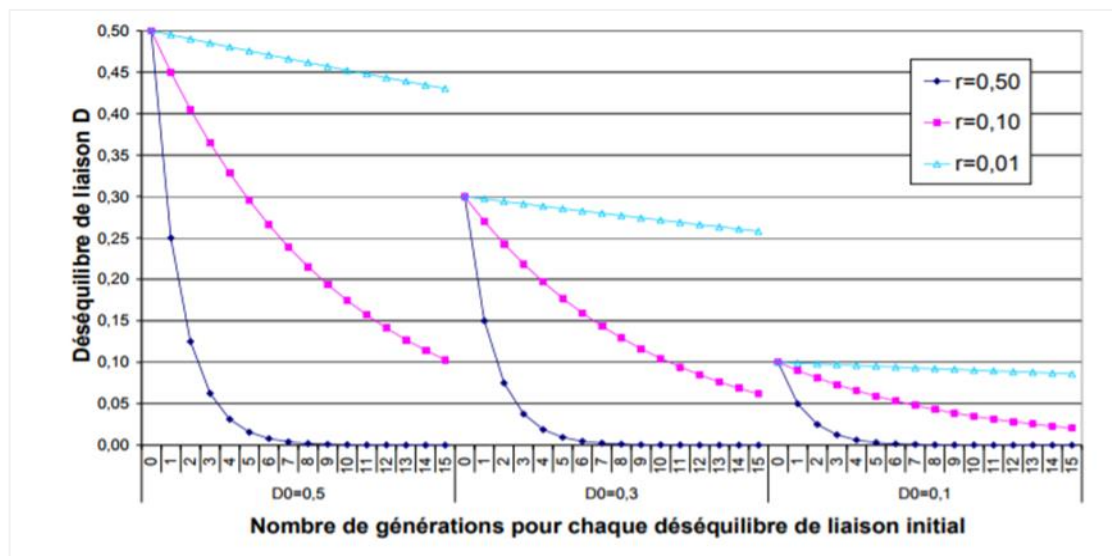


Figure 7: Décroissance du déséquilibre de liaison en fonction du temps, du taux de recombinaison (r) et du déséquilibre de liaison initial (D0)

Le DL des espèces autofécondées (comme le riz, blé, orge) est plus élevé que celui des espèces à pollinisation croisée (comme le maïs) (Flint-Garcia et *al.*, 2003). Par exemple, chez le blé, plante autogame, le DL peut s'étendre jusqu'à 300 kb (Bordes et *al.*, 2008) alors que chez le maïs, plante allogame, il s'étend sur moins de 2 kb (Flint-Garcia et *al.*, 2005). A l'intérieur d'une même espèce, la valeur du DL peut aussi varier (Figure 8). Chez le riz, Mather et *al.* (2007) ont trouvé que le DL s'étendait sur plus de 500 kb dans le groupe Japonica tempéré, sur environ 150 kb dans le groupe Japonica tropical et sur seulement 75 kb dans le groupe *Indica*. Le DL<sup>24</sup> aussi peut être hétérogène au sein du génome car le taux de recombinaison et les zones du génome subissant l'effet de la sélection sont variables. Notamment, le taux de recombinaison est souvent réduit près des centromères et élevé au niveau des télomères (Nachman, 2002).

L'étude de l'étendue du DL a aussi pour but d'estimer la résolution et la densité de marqueurs nécessaire pour l'analyse d'association. La résolution de la cartographie sera élevée si l'étendue du DL est courte, mais un grand nombre de marqueurs sera requis. Ce cas de figure est très adapté à la validation d'un gène candidat. Si le DL s'étend sur une longue distance, la résolution de la cartographie sera plus faible mais un nombre plus restreint de marqueurs sera suffisant. Dans ce cas, l'approche « genome wide » ou association avec balayage du génome entier peut être envisagée.

<sup>24</sup> Déséquilibre de liaison

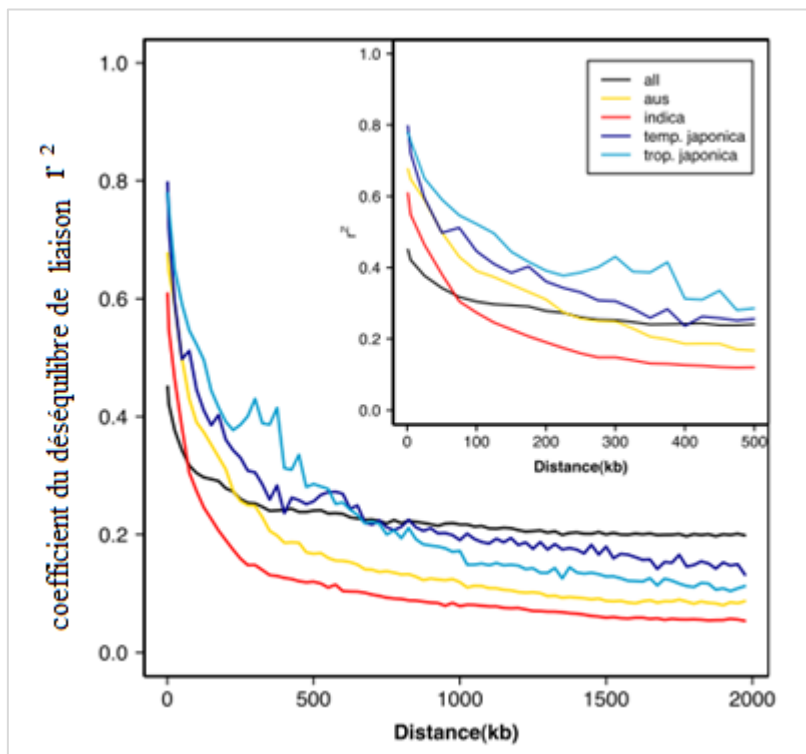


Figure 8: Exemple de l'extinction du déséquilibre de liaison au sein de différents groupes de l'espèce *Oryza sativa*

Source : Zhao et *al.*, 2011

### III.2. Structure de la population

L'existence d'une structure de la population (notée Q dans les analyses d'associations) ou d'un apparentement entre les individus d'une population (noté K dans les analyses d'associations) peut créer du DL significatif entre locus non liés, et donc entraîner des faux positifs. Le DL à longue distance peut être dû à l'admixture (mélange) de deux ou plusieurs sous-populations au sein desquelles la dérive ou la sélection ont entraîné des différences de fréquences alléliques. Les populations peuvent se structurer par groupe et à l'intérieur des groupes. Dans la figure 9, la population « a » représente une population idéale où il n'y a pas de structuration et où le niveau d'apparentement entre les individus est le même. La population « b » représente une population non structurée avec des niveaux d'apparentements inégaux entre individus. La population « c » présente deux groupes distincts avec des niveaux d'apparentements inégaux entre individus dans chaque groupe. La population « d » désigne deux groupes distincts avec des niveaux d'apparentements égaux entre individus dans chaque groupe. La population « e » montre une population très structurée avec des niveaux d'apparentements inégaux entre individus.

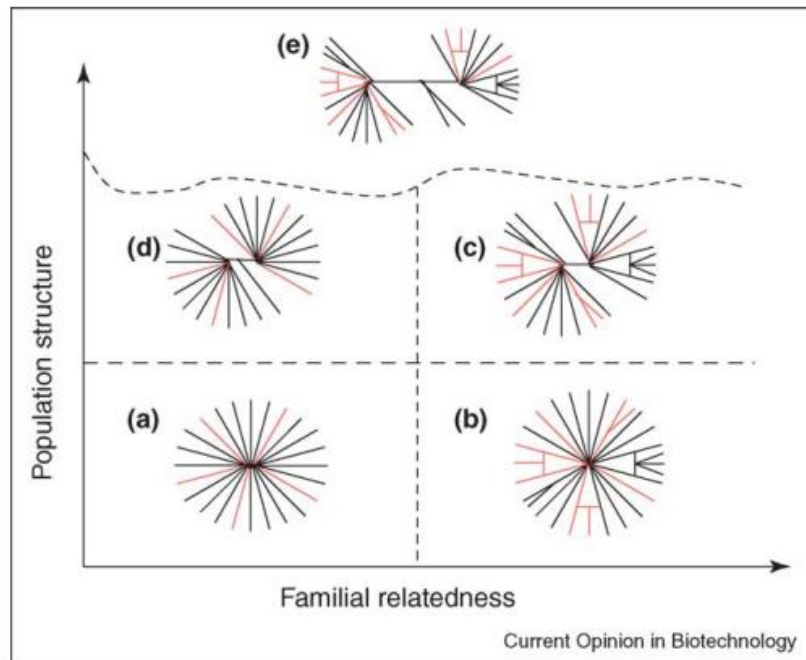


Figure 9: Exemples de différentes structurations d'une population rencontrées dans les études d'association

Source: Yu et Buckler, 2006

### III.2.1. Méthodes d'inférence de la structure Q

#### III.2.1.1. Arbre phylogénétique

C'est une approche pour étudier la proximité génétique des individus. La construction de l'arbre phylogénétique se fait à partir des fréquences alléliques. Cette méthode a été élaborée par Cavalli-Sforza et Edwards dans les années 60 où ils ont publié les premiers travaux de structure des populations. Actuellement, l'algorithme le plus souvent utilisé pour la construction de l'arbre phylogénétique est l'algorithme de *neighbor-joining*, proposé par Saitou et Nei en 1987, intégré dans différents logiciels (Jay, 2011). L'arbre est construit à partir d'une matrice qui contient des distances génétiques pour chaque paire d'individus. L'arbre peut ensuite être coupé selon les niveaux voulus afin de créer les différents groupes génétiques.

#### III.2.1.2. Modèle explicite avec le logiciel STRUCTURE

Le logiciel STRUCTURE implémente une méthode de clustering pour l'inférence de la structure génétique des populations à partir des données génétiques sous forme de marqueurs indépendants. Sur la base de leur génotype, il s'agit de grouper les individus en population, d'estimer le nombre de populations et aussi d'estimer le degré d'introgession/hybridation. Pritchard et *al.* (2000) ont proposé une des premières méthodes basées sur un modèle explicite qui permet de détecter la structure génétique des populations et qui suppose que les données génétiques peuvent être expliquées par un modèle dont les paramètres sont

inconnus. Ce modèle est implémenté dans le logiciel Structure. Il suppose l'existence de  $K$  populations (non prédéfinies) qui sont caractérisées chacune, à chaque locus, par un ensemble de fréquences alléliques. Les probabilités qu'un individu appartienne aux différentes populations sont appelées « coefficient d'appartenance », l'objectif est d'estimer les fréquences alléliques et les coefficients d'appartenance des individus. Le logiciel STRUCTURE crée des populations afin de minimiser l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg au sein de chacune d'elles.

### III.2.1.3. Analyse en composantes principales (ACP)

Les méthodes plus classiques de type ACP requièrent un temps de calcul plus court et ne nécessitent aucun modèle génétique contrairement aux méthodes bayésiennes. L'analyse en composantes principales est un outil d'analyse des données multidimensionnelles qui fait des projections de données sur un nombre réduit d'axes orthogonaux, tout en maximisant la variance des données projetées sur chacun des axes. L'ACP peut détecter des structures à partir d'un niveau minimum de différenciation génétique mais peut aussi cacher des structures lorsque les données sont constituées d'un plus grand nombre de marqueurs que d'individus. L'appartenance aux groupes est déterminée par les coordonnées individuelles sur les axes principaux de l'ACP retenus. Price *et al.* (2006) ont développé une approche utilisant l'ACP pour corriger les effets de structure dans les populations utilisées pour réaliser des études d'association pangénomique.

### III.2.2. Méthodes d'inférence de l'apparentement ou du kinship $K$

L'apparentement représente la relation familiale entre individus et constitue un deuxième niveau de structuration d'un panel. Il est mesuré par le coefficient d'apparentement. L'apparentement peut être estimé entre deux individus comme la fréquence d'allèles identiques hérités d'un ancêtre commun (identity by descent), le coefficient serait la probabilité d'identité par descendance. Toutefois, les allèles communs entre deux individus ne sont pas forcément issus d'un même ancêtre commun. Une autre estimation du coefficient d'apparentement a donc été proposée par Zhao *et al.* (2007) comme la proportion d'allèles communs entre deux individus. Les logiciels de traitement de l'analyse de l'association comme le logiciel TASSEL disposent d'outils pour analyser cette matrice d'apparentement.

## III.3. Cartographie de QTL par analyse d'association

### III.3.1. Approche par gènes candidats ou par balayage du génome entier

Deux approches peuvent être entreprises selon l'étendue du déséquilibre de liaison. Si le DL est faible, les études peuvent être axées vers l'approche « gène candidat », en associant le polymorphisme de séquences candidates à la variation phénotypique. Si le DL est fort, l'approche « genome wide » peut être mise en œuvre. La prise en compte de la structure de la population ( $Q$ ), de la matrice de kinship ( $K$ ) ou de



la combinaison des deux (K+Q) dans l'analyse d'association dépend de la relation génétique à l'intérieur du panel et la variabilité du caractère étudié (Figure 10).

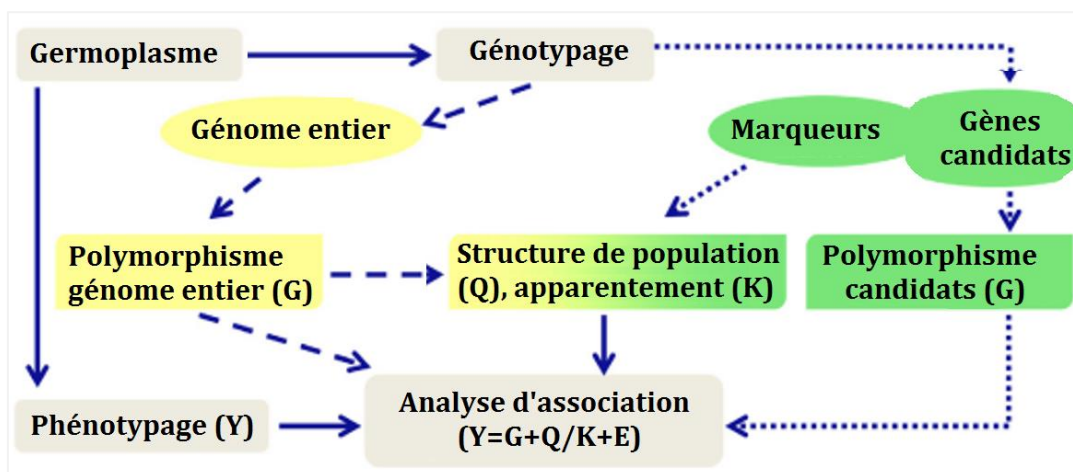


Figure 10: Schéma des approches de cartographie de QTL par analyse d'association

Contraste entre gène candidat coloré en vert et génome entier, coloré en jaune

Source : Zhu et al., 2008

L'approche par gène candidat « candidate gene association mapping » consiste à étudier un ensemble de gènes dont la fonction pourrait intervenir dans le caractère étudié puis à les tester directement par association. Dans cette étude, le choix de ces gènes est à priori biologique, c'est-à-dire que la fonction de ces gènes appartient à une voie métabolique associée aux caractères d'intérêts. La génétique d'association peut aussi être utilisée pour la validation de gènes candidats dans l'intervalle d'un QTL<sup>25</sup>, permettant de limiter le nombre de marqueurs utilisés. Toutefois, même si la biologie du caractère est bien comprise et qu'on connaît d'avance les gènes ou les régions chromosomiques à étudier, les approches par gène candidat ne peuvent identifier qu'une partie des déterminants génétiques, en laissant les autres régions chromosomiques non-connues.

L'approche « genome-wide » exige un très grand nombre de marqueurs. Il s'agit d'étudier une grande partie ou tout le génome sans aucun à priori sur l'identité des locus impliqués. Le GWAS (« Genome Wide Association Study ») est une méthode puissante pour détecter les régions impliquées dans le déterminisme génétique des caractères.

### III.3.2. Les modèles statistiques utilisés

L'effet confondant de la structure a été le principal écueil pour le développement des approches de la génétique d'association chez les plantes. L'analyse d'association implique un risque plus élevé d'erreurs

<sup>25</sup> Locus de caractères quantitatif

de type I (faux positifs) et de type II (faux négatifs) par rapport à l'analyse de QTL <sup>26</sup> dans un croisement biparental. Les faux positifs proviennent de la structuration de la population (Pritchard *et al.*, 2000) en sous-groupes qui peuvent créer des covariances entre individus. Si elles ne sont pas prises en compte lors de l'analyse, elles créent des biais dans l'estimation des effets des allèles (Kennedy *et al.*, 1992).

Dans les tests d'association, il faut rechercher le modèle le plus approprié entre un modèle linéaire généralisé (GLM) prenant en compte la structure (matrice de populations Q) (Pritchard *et al.*, 2000) et un modèle linéaire mixte (MLM) prenant en compte les coefficients d'apparentement (matrice d'apparentement K) ou la combinaison des deux (matrice Q + K) (Meuwissen *et al.*, 2001 ; Yu et Buckler, 2006). Cette méthode, appelée « Q+K » basée sur un modèle linéaire mixte (MLM) utilisant comme covariable la matrice de structure (Q) et la matrice de kinship (K) (respectivement comme effet fixe et effet aléatoire) a été proposée par Yu et Buckler (2006). Avec ce modèle, les risques d'erreurs de type I (détection de fausses associations) et de type II (non détection de vraies associations) sont réduits. En 2010, Zhang *et al.* ont proposé des approches permettant de réduire le temps de calcul : une méthode de compression (« compressed MLM ») et une méthode qui élimine la nécessité de recalculer les composantes de la variance (P3D). Ces méthodes sont disponibles dans le logiciel TASSEL.

Le modèle linéaire mixte (MLM) se présente comme suit :

$$Y = X\alpha + P\beta + K\mu + e$$

où Y : représente le phénotype,

X : représente le génotype,

P : représente la matrice de l'ACP <sup>27</sup> de la structure de la population Q,

K : représente la matrice relative à l'apparentement,

X $\alpha$  + P $\beta$  : représentent les effets fixes,

K $\mu$  + e : représentent les effets aléatoires.

### III.3.3. Avantages et limites de l'analyse d'association GWAS

L'analyse d'association GWAS <sup>28</sup> repose sur le fait de travailler sur des lignées distinctes non issues d'un croisement comme des collections, permettant ainsi de connaître l'historique des phénotypes mesurés pendant le développement des nouvelles variétés, d'exploiter une plus grande diversité allélique et d'obtenir une plus grande résolution grâce aux nombreuses recombinaisons historiques (Zhu *et al.*, 2008). Ceci donne aussi l'avantage de travailler en même temps sur un grand nombre d'individus représentatifs de l'espèce sans avoir à générer des populations de cartographie (Durand, 2011). L'utilisation de l'information sur la

<sup>26</sup> Locus de caractères quantitatifs

<sup>27</sup> Analyse en Composantes Principales

<sup>28</sup> Genome wide association study

décroissance rapide du déséquilibre de liaison permet de travailler à l'échelle du gène évitant ainsi des expériences de cartographie fine. L'analyse GWAS, en examinant tous les chromosomes pour identifier des régions associées aux caractères d'intérêts, possède le potentiel d'identifier les polymorphismes génétiques responsables de la variation des traits importants en agriculture.

Cependant, l'analyse GWAS peut parfois induire des erreurs comme les faux positifs à cause de la structure de la population et l'apparentement entre les individus. Si le panel est structuré et que l'on n'en tient pas en compte, il existe un fort risque de faux positif en termes d'association. Les modèles statistiques ne permettent pas de s'affranchir correctement de la structure de la population, la prise en compte de la structure de la population dans les analyses permet seulement de réduire le nombre de faux positifs mais augmente le nombre de faux négatifs (Bergelson et Roux, 2010). L'analyse GWAS exige aussi un grand nombre d'échantillons pour détecter le maximum de polymorphisme responsable de la variation des caractères complexes et un grand nombre de marqueurs. A part cela, l'analyse simultanée de nombreux allèles contribuant au phénotype conduit à la difficulté d'identifier les effets des allèles rares dans la population (Flint-Garcia et *al.*, 2005). L'analyse GWAS ne prend pas en compte l'interaction entre les locus et l'environnement. Cependant, la contribution d'un gène pour un trait peut dépendre de la condition environnementale (Korte et Farlow, 2013).

#### III.4. Études d'association chez le riz

L'évolution des technologies de génotypage (génotypage à haut débit, puces à ADN...) et le séquençage complet du génome de plus en plus de plantes ont fait progresser la recherche en génétique végétale. Le riz, en tant qu'espèce modèle pour étudier les monocotylédones (maïs, sorgho, blé,...), a fait l'objet de beaucoup d'étude à l'aide de ces moyens.

Pour le riz, différents caractères ont été évalués à travers la génétique d'association (Tableau 2) en allant de (i) la morphologie de la plante comme la hauteur de la plante, longueur de la panicule (Wen et *al.*, 2009 ; Yang et *al.*, 2015; Biscarini et *al.*, 2016), (ii) la morphologie et la qualité des grains (Borba et *al.*, 2010 ; McCouch et *al.*, 2016 ; Feng et *al.*, 2016; Si et *al.*, 2016), (iii) les caractères agronomiques (Borba et *al.*, 2010; Huang et *al.*, 2010 ; Zhao et *al.*, 2011 ; Huang et *al.*, 2012; Spindel et *al.*, 2015; Yano et *al.*, 2016), (iv) l'architecture racinaire (Courtois et *al.*, 2013), (v) la tolérance aux stress abiotiques comme la sécheresse et la chaleur (Ma et *al.*, 2016 ; Lafarge et *al.*, 2016), ainsi que (vi) la tolérance aux stress biotiques comme la bactériose « BLB » (Dilla-Ermita et *al.*, 2017) ou la maladie fongique due à la pyriculariose (Wang et *al.*, 2014; Raboin et *al.*, 2016; Zhu et *al.*, 2016; Kang et *al.*, 2016).

Une revue des études d'association publiées chez le riz a été réalisée en 2016 par Zhang et *al.* (2016). Cette revue présente un tableau récapitulatif jusqu'en 2015. Le tableau 2 qui suit présente un complément d'informations pour les études réalisées par la suite.

Tableau 2: Études d'association chez le riz publiées après la revue de Zhang et al. (2016)

Caractères étudiés	Nombre de variétés	Marqueurs utilisés	Niveau de signification	Référence
Résistance à la pyriculariose	150/190	10937/14187	$< 10^{-5}$	Raboin et al., 2016
Résistance à la pyriculariose	413	3835 SNP	$< 10^{-5}$	Zhu et al., 2016
Résistance à la maladie bactérienne des feuilles	285	40840 SNP	$< 10^{-5}$	Dilla-Ermita et al., 2016
Longueur des grains	1568	700000 SNP	$< 10^{-6}$	McCouch et al., 2016
Qualité des grains	227	1563570 SNP	$< 10^{-4}$	Xu et al., 2016
Longueur, largeur, épaisseur et poids des grains	469	5291 SNP	$< 10^{-3}$	Feng et al., 2016
Caractères agronomiques (Longueur, largeur et épaisseur des grains, etc)	342	493777 SNP	$< 10^{-7}$	Si et al., 2016
16 caractères (hauteur de la plante, longueur de la panicule, longueur de la feuille drapeau, longueur et largeur des grains, longueur et volume des racines, ...)	391	57000 SNP	$< 10^{-4}$	Biscarini et al., 2016
Hauteur de la plante et rendement en grain, coefficient de résistance à la sécheresse	270	1019883 SNP	$< 9,81 \times 10^{-7}$	Ma et al., 2016
Variation de l'orientation des talles (tiller angle)	529	1857845 SNP	$< 1,3 \times 10^{-6}$	Dong et al., 2016
Morphologie des panicules	242	30984 SNP	$< 10^{-5}$	Crowell et al., 2016
Efficience de l'utilisation de l'azote	184	157 SSR	$< 10^{-2}$	Liu et al., 2016
Caractéristique racinaire	182	21623 SNP	$< 10^{-4}$	Phung et al., 2016
Stérilité des épillets, hauteur de la plante, date de floraison.	167	13162 SNP	$< 10^{-5}$	Lafarge et al., 2017
Largeur des grains	570	1922258 SNP	$< 10^{-6}$	Zheng et al., 2017 b
Tolérance à la déficience en zinc	140	247000 SNP	$< 10^{-7}$	Lee et al., 2017
Tolérance à la déficience en zinc	108	365000 SNP	$< 10^{-4}$	Lee et al., 2018
Tolérance à l'aluminium	150	67511 SNP	$< 10^{-3}$	Zhao et al., 2018
Angle racinaire	162 / 169	16000/300000	$< 10^{-5}$	Bettembourg et al., 2017
Angle de la feuille drapeau	529	3916415 SNP	$6,6 \times 10^{-8}$	Dong et al., 2018
Forme et qualité des grains	59	525 SNP	$< 10^{-2}$	Mogga et al., 2018

## Chapitre II : VARIABILITE GENETIQUE DE L'EFFICIENCE DE L'UTILISATION DE L'AZOTE DU RIZ PLUVIAL

## Chapitre II : VARIABILITE GENETIQUE DE L'EFFICIENCE DE L'UTILISATION DE L'AZOTE DU RIZ PLUVIAL

### Genetic variability of nitrogen use efficiency in rainfed upland rice

Tatiana RAKOTOSON<sup>1</sup>, Julie DUSSERRE<sup>2</sup>, Philippe LETOURMY<sup>2</sup>, Isabelle RATSIMALA RAMONTA<sup>3</sup>, Tuong-Vi CAO<sup>4</sup>, Alain RAMANANTSOANIRINA<sup>1</sup>, Pierre ROUMET<sup>5</sup>, Nourollah AHMADI<sup>4</sup>, Louis-Marie RABOIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FOFIFA, SRR Antsirabe, BP 230, Antsirabe 110, Madagascar.

<sup>2</sup> CIRAD, UPR AIDA, TA B-115 / 02, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>3</sup> Université d'Antananarivo, Faculté des sciences, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar.

<sup>4</sup> CIRAD, UMR AGAP, TA A-108 / 03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France.

<sup>5</sup> INRA, UMR AGAP, Campus Supagro Montpellier, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France.

Ce chapitre rapporte les travaux effectués concernant la variabilité génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du riz pluvial. L'article relatif à ces travaux, intitulé « Genetic variability of nitrogen use efficiency in rainfed upland rice », est publié dans le journal «Field Crops Research» en 2017 (volume 213, p 194 à 203) et rapporté ici en version française.

### I. Introduction

En Afrique subsaharienne (ASS) où le riz pluvial représente 38% des surfaces cultivées, la demande en riz augmente. Cependant, les rendements en riz pluvial sont très faibles, allant de 1 à 2 t/ha (Balasubramanian, 2007). En ASS, le riz pluvial est principalement cultivé pour la subsistance par des agriculteurs avec des systèmes de production à faibles intrants sur des sols pauvres (Saito et Futakuchi, 2009). À Madagascar, où la riziculture pluviale est en expansion sur les Hauts Plateaux (Raboin et *al.*, 2014), la situation est similaire. L'utilisation d'engrais minéraux est très faible en raison de son coût élevé (Minten et *al.*, 2007), le fumier représente généralement la seule source d'engrais (Alvarez et *al.*, 2014). Face à ces contextes économiques et environnementaux non touchés par la révolution verte, il est possible d'adapter les cultures à ce contexte de faibles intrants par le biais des programmes de sélection ciblant spécifiquement les environnements à faibles intrants (Atlin et Frey, 1989; Ceccarelli, 1996). La disponibilité en azote du sol est un facteur limitant majeur dans les systèmes agricoles à faibles intrants minéraux avec une grande dépendance vis-à-vis des sources d'azote organique et de leur minéralisation (Dawson et *al.*, 2008). L'azote est l'un des éléments minéraux les plus importants pour le développement des plantes et l'efficacité de l'utilisation de l'azote peut jouer un rôle important dans les systèmes à faibles intrants. Pour un niveau de fertilisation donné, l'amélioration de la NUE devrait avoir un impact positif sur la production de riz qualitativement et quantitativement. La variabilité génétique de l'efficacité d'utilisation de l'azote disponible dans le matériel génétique utilisé par les sélectionneurs, le niveau d'interaction génotype × azote et la

précision de la sélection avec différents niveaux d'azote doivent être évalués afin d'identifier les stratégies de sélection appropriées (Garnett et al., 2015).

L'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) est généralement définie comme le rendement en grains par unité d'azote fournie par le sol et par l'engrais (Moll et al., 1982). NUE est le produit de l'efficacité de l'absorption d'azote (NUPE; quantité d'azote absorbé par la plante par unité d'azote disponible dans le sol) et de l'efficacité de l'utilisation/conversion de l'azote (NUTE; rendement en grains obtenus par unité d'azote absorbé). NUE et ses composantes sont des caractères quantitatifs complexes et l'étude de leurs relations avec d'autres caractères morphologiques ou physiologiques plus simples pourrait aider à comprendre les mécanismes impliqués dans NUE et à identifier des moyens d'améliorer l'efficacité de la sélection. La variabilité génétique de NUPE et de NUTE a été démontrée pour un grand nombre de cultures (Hirel et al., 2007). Des interactions entre génotype et azote peuvent exister (Le Gouis et al., 2000; Gallais et Coque, 2005; Ju et al., 2015). La variabilité génétique des caractères liés à NUE et à ses composantes (NUPE et NUTE) doit donc être étudiée à la fois à faible et à fort niveaux d'azote.

De nombreuses études sur le riz ont révélé une variabilité génétique importante pour NUE, principalement pour le riz irrigué ou le riz pluvial de bas fond (De Datta et Broadbent 1988, 1990, 1993; Tirol-Padre et al., 1996; Singh et al., 1998; Inthapanya et al., 2000; Koutroubas et Ntanos, 2003; Haefele et al., 2008; Wu et al., 2016). Une corrélation négative entre NUTE et la teneur en N des grains et pailles a été rapportée (Tirol-Padre et al., 1996; Inthapanya et al., 2000; Koutroubas et Ntanos, 2003; Wu et al., 2016). Il a été démontré que le NUTE des variétés de riz du groupe *indica* est supérieur à celui des variétés de riz du groupe *japonica* en raison à la fois d'un indice de récolte plus élevé et d'un indice de récolte azoté plus élevé (Koutroubas et Ntanos, 2003). Les rendements en grains du riz à faible et à fort niveaux d'azote se sont révélés être significativement corrélés (De Datta et Broadbent, 1990; Singh et al., 1998; Haefele et al., 2008) bien que cette corrélation soit plus faible dans les conditions pluviales de bas fond que dans les conditions irriguées (Haefele et al., 2008). En revanche, Ju et al. (2015) ont signalé une interaction significative entre le niveau d'azote et le génotype pour le rendement en grains et l'azote absorbé en conditions irriguées. Ils ont associé le NUE élevé de deux variétés de *japonica* cultivées en bas-fond à une biomasse racinaire plus importante, une distribution racinaire plus profonde, des racines plus longues et une plus grande activité d'oxydation des racines. Pan et al. (2016) ont également constaté des corrélations positives significatives entre l'azote total absorbé et la longueur totale, la superficie et le volume des racines. Il a été démontré que la remobilisation de l'azote joue un rôle central dans le NUE du riz, comme elle représente 70 à 90% de l'azote total des panicules (Mae, 1997; Tabuchi et al., 2007). De Datta et Broadbent (1993) ont constaté que la remobilisation, mesurée par l'évolution du rapport entre le poids des feuilles et la biomasse totale ou le pourcentage de perte d'azote des feuilles entre l'absorption maximale de l'azote des

feuilles et la récolte, était liée au NUE. Wu et *al.* (2016) ont dissocié la teneur en N des pailles en teneur en N des feuilles et teneur en N des tiges, révélant ainsi des relations distinctes avec le NUTE: l'amélioration de NUTE était associée à une faible teneur en N des feuilles lorsque le NUTE était inférieur à 50 kg grains /kg N, et au-delà, l'amélioration de NUTE était associée à une diminution de la teneur en N des tiges. Afin d'améliorer NUTE, ces auteurs ont donc proposé d'augmenter la translocation de l'azote à partir des tiges plutôt qu'à partir des feuilles, afin de retarder la sénescence des feuilles pendant la période de remplissage du grain.

Le riz pluvial est souvent cultivé sans apport d'azote de synthèse malgré la faible fertilité du sol, mais le NUE du riz dans cet écosystème est encore très mal connu. Jusqu'à présent, seules des données provenant d'expériences en serre sont disponibles (Zaharah et Hanafi, 2009, 2014; Fageria et *al.*, 2010), celles-ci ont montré des différences significatives entre les variétés de riz pluvial pour l'azote total absorbé. L'azote total absorbé à maturité par six variétés locales de riz pluvial était corrélé à la longueur de leurs racines 14 jours après l'ensemencement (Zaharah et Hanafi, 2009). L'objectif de la présente étude est donc d'étudier (i) le niveau de la variabilité génétique pour le NUE des variétés de riz *japonica tropical* cultivées dans des conditions pluviales; (ii) les relations entre les composantes de NUE et d'autres caractères agronomiques afin d'identifier les caractères cibles pour l'amélioration de NUE surtout dans les conditions de faible fertilité du sol. L'étude a été réalisée à moyenne altitude à Madagascar, à l'aide de 13 variétés de riz pluvial, pendant trois campagnes. Étant donné que l'étude est focalisée sur la diversité génétique pour NUE, les expériences ont été menées avec les doses recommandées de P et de K afin de minimiser les risques d'interaction avec un stress occasionné par d'autres éléments.

## II. Matériels et méthodes

Les expérimentations ont été menées pendant trois campagnes consécutives, 2012-2013, 2013-2014 et 2014-2015 (dénommées respectivement 2013, 2014 et 2015). Chacune d'elles s'étend de novembre de l'année en cours jusqu'en avril de l'année suivante.

### II.1. Description du site, matériel végétal

Les expérimentations ont été menées à Ivory, dans le Moyen Ouest de Madagascar (19°33'27 Sud, 46°24'43 Est, 960 m d'altitude). Le sol est de type ferrallitique, contenant 0,82 g/kg d'azote total; 16,6 g/kg de matières organiques; 0,17 cmolc/kg de K échangeable; 4,47 mg/kg de P Olsen et un pH de 4,98 dans les 20 premiers centimètres du sol. La pente du champ expérimental était inférieure à 1%. La température mensuelle moyenne sur le site était comprise entre 23,6°C et 25,7°C pendant les trois campagnes. Les précipitations cumulées pendant la campagne ont été de 1095 mm en 2013, 971 mm en 2014 et 1600 mm



en 2015. Les précipitations cumulées par décade, les dates de semis, les dates moyennes de floraison et de récolte et les dates d'apport d'azote pendant les trois campagnes sont présentées à la figure 11.

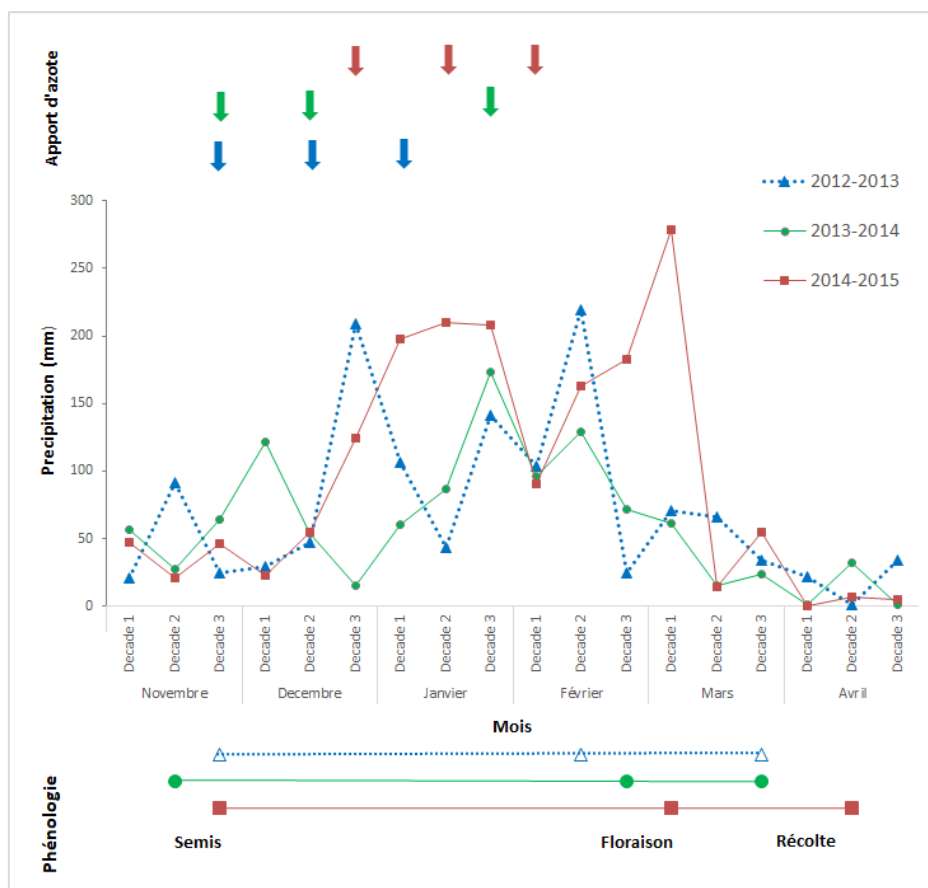


Figure 11: Distribution de la pluviométrie cumulée par décade, date de semis, date de floraison moyenne et de récolte moyenne, date d'apport d'azote lors des trois campagnes de riz (2013 à 2015) à Ivory

Le matériel végétal utilisé a été composé de 13 variétés de riz *japonica* tropical. Ces variétés sont adaptées aux conditions pluviales du Moyen Ouest de Madagascar et sont bien réparties dans la diversité génétique des variétés *japonica* tropical utilisées dans le programme de sélection mené à Madagascar par FOFIFA et le Cirad (Annexe 1). Elles proviennent de différents programmes de sélection: CIAT en Colombie, IAC et EMBRAPA au Brésil, FOFIFA / Cirad à Madagascar, Cirad au Brésil et Africa Rice en Côte d'Ivoire. Une brève description de ces variétés est présentée dans le tableau 3.

## II.2. Conduite des cultures

Les trois expérimentations ont été conduites en utilisant différentes rotations avec des légumineuses. Dans la première et la deuxième expérimentation, conduites dans deux champs adjacents, les précédents culturaux ont été une légumineuse mucuna (*Mucuna pruriens*) cultivée en 2012 et 2013 respectivement. Lors de la troisième campagne (menée en 2015 dont le terrain a été le même que celui de la première campagne), le précédent cultural a été le pois de terre (*Vigna Subterranea*) cultivé en 2014. Les résidus de

*Mucuna* sont incorporés au sol, tandis que les grains et les pailles des autres cultures (pois de terre et riz) sont exportés.

Tableau 3: Principales caractéristiques des 13 variétés de riz pluvial utilisées dans l'étude

Nom des variétés	Abréviation dans le texte	Abréviation dans la figure	Centre de recherches	Pays	Hauteur (cm)	Date de floraison (j)
126-C409-8-1-2	126C409	126C	CIAT	Colombie	97	84
B22 (CNA 095-BM 30-BM 27-P 35-2)	B22	B22	EMBRAPA	Brésil	112	88
CNA 4136 (CNA 095-BM8-BM 35-P2)	CNA4136	CNA	EMBRAPA	Brésil	117	91
FOFIFA 159	F159	F159	CIRAD-FOFIFA	Madagascar	122	94
IAC 25	IAC25	IAC	IAC	Brésil	129	93
NERICA 10	N10	N10	AFRICA RICE	Côte d'Ivoire	93	77
NERICA 4	N4	N4	AFRICA RICE	Côte d'Ivoire	105	90
NERICA 9	N9	N9	AFRICA RICE	Côte d'Ivoire	98	89
PCT11 MAD2007\0\0 3-3-1-3-2-2	PCT11	PCT	CIAT	Colombie	90	86
PRIMAVERA	PRIMAVERA	PRI	IAC	Brésil	109	94
SCRID195-1-5-3-1	SCRID195	SC	CIRAD-FOFIFA	Madagascar	113	97
SEBOTA 402	SEBOTA402	SB	CIRAD	Brésil	103	94
WAB 880-1-32-1-1-P2-HB-1	WAB880	WAB	AFRICA RICE	Côte d'Ivoire	115	92

CIAT: « International Center for Tropical Agriculture » – Colombie.

CIRAD: Centre de coopération internationale de recherche agronomique pour le développement – France.

EMBRAPA: « Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária » – Brésil.

FOFIFA: Centre national de recherche appliqué au développement rural – Madagascar.

IAC: « Instituto Agrônômico de Campinas » – Brésil.

La préparation des parcelles pour la culture du riz a commencé par des labours avec une charrue attelée suivis des affinements manuels. Quatre à six graines par poquet sont semées avec un espacement de 20 cm × 20 cm. Juste avant le semis, une fertilisation de base (fumiers à 5000 kg/ha, triple superphosphate à 69 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, sulfate de potassium à 62,4 kg/ha de K<sub>2</sub>O et de dolomie à 500 kg/ha) est appliquée sur toutes les parcelles. La méthode et la dose d'application des fumiers correspondent aux pratiques classiques de fertilisation du riz pluvial par les agriculteurs de la région. Pour protéger la culture des vers blancs (stade larvaire des scarabées) et des scarabées adultes se nourrissant de racines du riz (Randriamanantsoa et *al.*, 2010), les semences de riz ont été traitées à l'aide d'un insecticide (35% d'imidaclopride + 10% de thirame à 2,5 g/kg de graines) (Ratnadass et *al.*, 2012) avant le semis. Le désherbage a été effectué à la main.

### II.3. Dispositif expérimental et niveau d'azote

Les 13 variétés ont été évaluées sous deux niveaux d'azote inorganique: un faible niveau d'azote (noté LN, « Low Nitrogen ») sans apport d'azote et un niveau élevé d'azote (noté HN, « High Nitrogen ») correspondant à un apport d'azote sous forme d'urée de 90 kg N/ha en 2013 et 2014; et 120 kg N/ha en 2015. L'urée (46% d'N) a été fractionnée en trois apports à quantité égale et a été appliquée au stade de la levée, du début de tallage et de début de la montaison (Figure 11). Le dispositif expérimental est un dispositif de blocs randomisés avec six répétitions. Vingt-six combinaisons de traitements ont été comparées (13 variétés × 2 niveaux d'azote). La taille de la parcelle élémentaire est de 2 m × 3,8 m avec un total de 190 poquets par parcelle. Les blocs sont positionnés perpendiculairement à la pente du terrain.

### II.4. Echantillonnage et mesure phénotypique

#### II.4.1. Mesure de la biomasse, du rendement et des composantes du rendement

Au stade de la floraison, l'indice de surface foliaire (LAI, « Leaf Area Index») a été mesuré de manière non destructive dans des parcelles élémentaires à l'aide d'un SunScan placé au niveau du sol. Le LAI est défini comme la surface totale des feuilles sur une surface donnée et est utilisé comme indicateur de la biomasse aérienne. Le Sunscan estime un indice de surface couverte par la plante comprenant les tiges, les panicules et les feuilles. Le LAI a été mesuré au stade de la floraison avec cinq lectures par parcelle. Ensuite, dans chaque parcelle, les plantes entières de quatre poquets (0,16 m<sup>2</sup>) sont coupées au niveau du sol et regroupées pour former un échantillon. Les échantillons de plantes sont séchés au four à 60° C pendant 72 h et pesés pour estimer la biomasse à la floraison (BFL, « Biomass at flowering ») (Tableau 4).

À maturité, neuf poquets (0,36 m<sup>2</sup>) sont récoltés au milieu de chaque parcelle et séparés en pailles et panicules. Les panicules sont comptées, séparées à la main et les grains pleins sont séparés des grains vides. Les poids des grains pleins et grains vides sont déterminés après séchage à l'étuve à 60°C pendant 72 h. Les grains pleins sont utilisés pour estimer le rendement en grains (GY, « Grain Yield ») et la teneur en N des grains (GNC, « Grain Nitrogen Concentration »). Deux sous-échantillons de 200 grains pleins et de 200 grains vides sont pesés pour calculer le nombre total de grains pleins et grains vides ainsi que le poids de mille grains (TGW, « Thousand Grain Weight »). Le nombre de panicules par mètre carré (PANM2, « Panicle per square meter »), le nombre d'épillets par panicule (SPIPAN, « Spikelet per Panicle ») et le pourcentage de grains pleins (FG, « Filled Grain ») sont calculés. Les échantillons de pailles sont séchés à l'étuve à 60°C pendant 72 h et pesés pour estimer le rendement en pailles (SY, « Straw Yield »). L'indice de récolte (HI, « Harvest Index ») est ensuite calculé à partir de GY et SY (Tableau 4).

Tableau 4: Description des 21 caractères mesurés sur le riz pluvial

Caractères	Signification en anglais	Abréviation	Formule	Unité
Biomasse de la plante à la floraison	«Biomass at flowering (aboveground) »	« BFL »	$10 \times \text{biomasse des 4 pqt} / 0,16$	kg/ha
Efficience agronomique de l'azote apporté	«Agronomic efficiency of N applied»	AEN	$GY_{HN} - GY_{LN} / N \text{ apporté}$	kg grain / kg N
Efficience d'absorption de l'azote	«Nitrogen uptake efficiency»	NUPE	TNUP/N disponible dans le sol	kg N/kgN
Efficience de l'utilisation/conversion de l'azote	«Nitrogen utilization efficiency»	NUTE	GY/TNUP	kg grain /kgN
Efficience de l'utilisation de l'azote	«Nitrogen use efficiency»	NUE	GY/N disponible dans le sol	kg grain /kgN
Pourcentage de grains pleins	«Filled Grain»	FG	$100 \times (\text{nb grains pleins/nb total de grains})$	%
Floraison (50% plante)	«Days to flowering»	DTFL	Nb de jours entre le semis et la floraison	j
Hauteur	«Plant Height»	PH	-	cm
Indice de récolte	«Harvest Index»	HI	$GY / (GY + SY)$	-
Indice de récolte azoté	«Nitrogen Harvest Index»	NHI	$GNC \times (GY / TNUP)$	-
N absorbé par la plante à floraison	«Nitrogen uptake at flowering»	FLNUP	$BFL \times FLNC / 100$	kg/ha
N absorbé par la plante après la floraison	«Nitrogen uptake after flowering»	POSTFLNUP	$TNUP - (BFL \times FLNC / 100)$	kg/ha
N total absorbé par la plante à maturité	«Total N uptake»	TNUP	$(GNC \times GY) + (SNC \times SY)$	kg/ha
Nombre d'épillets/panicule	«Spikelets per panicle»	SPIPAN	Nb d'épillets dans 6 pqt / nb panicules dans 6 pqt	-
Nombre de panicules/m <sup>2</sup>	«Panicles per square meter»	PANM2	Nb de panicules dans 6 pqt/0,24	-
Poids de mille grains	«Thousand Grain Weight»	TGW	Poids de 200 grains pleins $\times 5$	g
Rendement en grains	«Grain Yield»	GY	$PANM2 \times SPIPAN \times FG \times TGW \times 10$	kg/ha
Rendement en pailles	«Straw Yield»	SY	$10 \times (\text{biomasses des 6 pqt}/0,24)$	kg/ha
Teneur en N de la plante à floraison	«Whole plant N concentration at flowering»	FLNC	Teneur en N dans la plante dans 4 pqt à floraison	%
Teneur en N des grains	«Grain N concentration»	GNC	Teneur en N dans les grains dans 6 pqt	%
Teneur en N des pailles	«Straw N concentration»	SNC	Teneur en N dans les pailles dans 6 pqt	%

N : azote  
pqt : poquet  
nb : nombre  
HN : fort niveau d'azote  
LN : faible niveau d'azote

#### II.4.2. Mesure de la teneur en azote

La teneur en azote des biomasses aériennes obtenues à la floraison (FLNC), la teneur en azote des grains (GNC) et des pailles (SNC) au moment de la récolte sont déterminées par la spectroscopie proche infrarouge (SPIR). D'une part, des échantillons secs (séchés au four à 60° C pendant 72 h), broyés en utilisant un tamis avec une granulométrie inférieure à 1 mm (à l'aide d'un broyeur) sont passés sur un spectromètre proche infrarouge à l'aide d'un monochromateur (LabSpec 4, longueurs d'onde comprises entre 1000 et 2500 nm). Tous les échantillons sont scannés quatre fois et c'est la moyenne des quatre spectres obtenus qui est utilisée. D'autre part, une méthode de laboratoire de référence (méthode de combustion Dumas) a été utilisée pour déterminer la teneur en N des échantillons. Une première équation de calibration a été construite pour estimer FLNC et SNC à l'aide d'un lot de 188 échantillons collectés au moment de la floraison et de 182 échantillons collectés à la récolte. Cette équation a donné un coefficient de détermination  $r^2$  de 0,97 et une erreur type de prédiction (SEP) de 0,1 (Annexe 2b). Une deuxième équation a été construite pour estimer la GNC à l'aide de 179 échantillons de grains prélevés au moment de la récolte, avec un  $r^2$  de 0,94 et une SEP de 0,06 (Annexe 2b).

#### II.4.3. Mesure d'autres caractères agronomiques

La date de floraison (DTFL, « Days to flowering ») est notée pour chaque variété au stade de floraison 50%, c'est-à-dire lorsque 50% des plantes d'une parcelle élémentaire ont fleuri. L'azote total absorbé à la maturité (TNUP), l'indice de récolte azoté (NHI) et l'azote absorbé après la floraison (POSTFLNUP) sont calculés selon les formules présentées dans le tableau 4. L'estimation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et de ses composantes (l'efficacité d'absorption d'azote et l'efficacité de la conversion de l'azote) est calculée selon la méthode suggérée par Moll et *al.* (1982). La quantité d'azote disponible du sol est estimée, par bloc, comme la quantité maximale d'azote absorbé par la plante dans les parcelles sans azote (LN). L'efficacité agronomique de l'engrais azoté (AEN), qui représente la quantité de grains produite par unité d'azote appliquée, est aussi calculée et présentée dans le tableau 4.

#### II.5. Analyses statistiques

L'analyse de la variance a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse statistique SAS/STAT (version 9.4). Les sources de variation ont été l'année (A), les génotypes (G), les niveaux d'azote (N), l'interaction année  $\times$  génotype (A $\times$ G), l'interaction année  $\times$  niveau d'azote (A $\times$ N), l'interaction génotype  $\times$  niveau d'azote (G $\times$ N) et l'interaction année  $\times$  niveau d'azote  $\times$  génotype (A $\times$ N $\times$ G). Ces facteurs sont tous considérés comme des facteurs à effets fixes (modèle  $Y =$  année, génotype, niveau d'azote, répétition, année  $\times$  génotype, année  $\times$  niveau d'azote, génotype  $\times$  niveau d'azote, année  $\times$  génotype  $\times$  niveau d'azote). Les coefficients de corrélation phénotypique de Pearson ont été calculés pour tous les caractères à l'aide de

PROC CORR (SAS). L'héritabilité au sens large ( $H^2$ ) de tous les caractères à chaque niveau d'azote a été calculée à partir des composantes de la variance obtenues à l'aide de l'option REML de SAS PROC VARCOMP. Dans le modèle, la répétition a été considérée comme un effet fixe et le génotype et l'interaction génotype  $\times$  année ont été considérés comme des effets aléatoires. La formule est la suivante :

$$H^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P,$$

où  $\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_I/n + \sigma^2_E /nr$ .  $\sigma^2_G$  : variance génotypique.  $\sigma^2_I$  : variance de l'interaction.  $\sigma^2_E$  : variance de l'erreur.  $n$  : nombre d'année et  $r$  : nombre de répétition.

La contribution de la variation des composantes (NUPE et NUTE) à la variation de NUE, selon la méthode décrite par Moll et *al.* (1982), a été analysée pour chaque niveau d'azote et pour chaque année. Si  $X1_n$ ,  $X2_n$  représentent le logarithme des deux composantes à  $n^{\text{ème}}$  niveau d'azote, alors  $Y_n$  représente le caractère résultant et est donné par :

$$Y_n = X1_n + X2_n ;$$

$\sum (X1_n Y_n) / \sum Y_n^2$  et  $\sum (X2_n Y_n) / \sum Y_n^2$  représentent la contribution nette de chaque composante dans la variation du caractère résultant.

### III. Résultats

#### III.1. Interaction du génotype et du niveau d'azote avec l'année

Les résultats de l'analyse de variance combinée sur trois années pour les 21 caractères agronomiques mesurés sur les 13 variétés de riz pluvial sont présentés dans le tableau 5. Les effets de l'année, du génotype et du niveau d'azote ont été hautement significatifs au seuil de 5% pour tous les caractères. Une interaction année  $\times$  niveau d'azote (A $\times$ N) et année  $\times$  génotype (A $\times$ G) significative ( $\alpha=5\%$ ) a été observée pour la plupart des caractères mesurés. Compte tenu de ces interactions, les résultats sont présentés séparément par année dans les paragraphes suivants. Par ailleurs, les effets de l'interaction génotype  $\times$  niveau d'azote (G $\times$ N) ont été globalement faibles et statistiquement significatifs uniquement pour FLNC<sup>29</sup>, GNC<sup>30</sup>, HI<sup>31</sup>, NUE et NUTE<sup>32</sup>. Six caractères ont une héritabilité inférieure à 0,5 (Tableau 5). À l'exception de SNC<sup>33</sup> et NUE, ces caractères sont directement liés à l'absorption de l'azote (NUPE<sup>34</sup>, TNUP<sup>35</sup>, FLNUP<sup>36</sup>, POSTFLNUP<sup>37</sup>). En général, les valeurs de l'héritabilité n'ont pas beaucoup changé entre les niveaux d'azote.

<sup>29</sup> Teneur en azote des biomasses aériennes obtenues à la floraison

<sup>30</sup> Teneur en azote des grains

<sup>31</sup> Indice de récolte

<sup>32</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

<sup>33</sup> Teneur en azote des pailles

<sup>34</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>35</sup> Azote total absorbé par la plante à maturité

<sup>36</sup> Azote absorbé par la plante à la floraison

<sup>37</sup> Azote absorbé par la plante après la floraison

Tableau 5: Valeur F de Fisher et significativité des 21 caractères mesurés à partir de l'analyse de la variance combinant les facteurs année, génotype et niveaux d'azote et valeur de l'héritabilité au sens large ( $H^2$ ) à faible niveau d'azote (LN) et à fort niveau d'azote (HN) pour chacun des caractères

Caractère	Année (A)	Niveau d'azote (N)	Génotype (G)	Répétition	A × N	A × G	N × G	A × N × G	$H^2_{LN}$	$H^2_{HN}$
BFL	97,06 **	168,66 **	19,76 **	4,24 **	17,29 **	4,22 **	0,95 ns	0,82 ns	0,76	0,76
DTFL	2253,1 **	19,59 **	255,37 **	4,19 **	10,09 **	9,77 **	1,37 ns	1,16 ns	0,95	0,97
FG	66,81 **	69,99 **	32,52 **	2,90 **	1,44 ns	3,05 **	1,74 ns	1,53 ns	0,88	0,86
FLNC	123,68 **	230,65 **	39,27 **	3,50 **	36,79 **	3,89 **	2,75 **	1,21 ns	0,83	0,90
FLNUP	9,42 **	327,95 **	5,09 **	4,49 **	31,85 **	2,91 **	1,05 ns	1,12 ns	0,52	0,25
GNC	103,93 **	335,16 **	11,04 **	4,38 **	42,09 **	2,45 **	1,95 *	1,25 ns	0,65	0,76
GY	150,04 **	87,44 **	8,99 **	3,35 **	14,73 **	3,16 **	0,63 ns	1,24 ns	0,50	0,59
HI	158,21 **	53,70 **	100,25 **	3,08 **	3,31 *	6,04 **	2,73 **	1,60 *	0,93	0,93
LAI	91,90 **	372,76 **	21,36 **	8,08 **	25,37 **	3,54 **	1,17 ns	1,06 ns	0,84	0,76
NHI	74,73 **	8,54 **	34,49 **	2,49 **	5,36 **	2,35 **	1,13 ns	2,09 **	0,84	0,92
NUE	15,97 **	520,29 **	8,56 **	4,47 **	5,26 **	3,32 **	1,81 *	1,84 **	0,48	0,58
NUPE	13,32 **	194,69 **	3,94 **	3,49 **	8,43 **	2,28 **	1,19 ns	1,69 *	0,20	0,31
NUTE	18,91 **	312,83 **	11,91 **	2,35 **	24,16 **	2,28 **	2,16 *	1,71 *	0,67	0,80
PANM2	71,54 **	164,29 **	22,89 **	2,92 **	9,61 **	1,34 ns	0,75 ns	0,85 ns	0,89	0,92
POSTFLNUP	44,29 **	12,03 **	5,30 **	1,52 ns	1,67 ns	2,58 **	1,23 ns	1,29 ns	0,37	0,44
SNC	41,26 **	85,47 **	3,51 **	2,35 **	4,79 **	1,27 ns	1,39 ns	1,77 *	0,58	0,00
SPIPAN	130,11 **	13,79 **	25,01 **	2,74 **	9,50 **	3,71 **	0,48 ns	0,59 ns	0,78	0,88
SY	159,31 **	237,10 **	17,21 **	4,00 **	13,87 **	3,05 **	0,68 ns	1,04 ns	0,74	0,79
TGW	215,14 **	10,90 **	141,59 **	1,21 ns	1,12 ns	5,29 **	0,62 ns	0,85 ns	0,96	0,95
TNUP	143,13 **	274,84 **	3,69 **	4,13 **	26,20 **	2,14 **	0,72 ns	1,19 ns	0,17	0,33
AEN	10,71 **		0,51 ns	1,27 ns		1,00 ns				
ddl	2	1	12	15	2	24	12	24		

\*\* : valeur significative, respectivement, au seuil de 1% et 5%

ns : non significatif au seuil de 5%

Les conditions climatiques lors des différentes campagnes ont été très contrastées, principalement en raison de la distribution très différente des précipitations (Figure 11). Les précipitations cumulées entre le semis et la récolte ont été de 1095 mm en 2013, 971 mm en 2014 et 1600 mm en 2015, alors que l'évapotranspiration cumulée des cultures de référence est de 672, 614 et 548 mm, le rayonnement journalier cumulé était de 3008, 3116 et 2927 MJ/m<sup>2</sup> et les degrés-jours cumulés (au-dessus d'une base de 10° C) étaient de 1628, 1684 et 1667 respectivement en 2013, 2014 et 2015. Ces différences quant à la distribution des précipitations ont probablement affecté la disponibilité en azote du sol à chaque stade phénologique du riz, comme l'a déjà signalé Mae (1997). Par exemple, le nombre de panicules par mètre carré (PANM2), déterminé pendant la phase végétative (de l'émergence à l'initiation paniculaire), est plus élevé en 2013 qu'en 2014 et 2015 (Tableau 6). À l'inverse, le nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), déterminé pendant la phase de reproduction (de l'initiation paniculaire à la floraison), est plus élevé en 2014 qu'en 2013 et en 2015. En 2013 et 2014, les rendements en grains moyens sont supérieurs à ceux de 2015, c'est l'année qui est caractérisée par une forte précipitation. Par exemple, en LN<sup>38</sup>, le rendement en grains (GY) moyen a été de 5247 kg/ha, de 5810 kg/ha et de 3629 kg/ha en 2013, 2014 et 2015 respectivement (Tableau 6). En 2014, un effet très limité de la fertilisation azotée minérale sur le rendement (3% seulement; 5964 kg/ha en HN<sup>39</sup> et 5810 kg/ha en LN) est observé.

Ces conditions climatiques contrastées semblent avoir interagi avec le développement de chaque variété, principalement en fonction de leur cycle. Par exemple, en 2013, le rendement en grains de la variété à cycle long SCRID195, était le plus élevé en LN (1<sup>er</sup> rang) et le deuxième rang en HN (Figure 12 ; Annexe 2 a), alors qu'il s'agissait de l'une des variétés les moins performantes en 2014 (11<sup>ème</sup> rang en HN et 10<sup>ème</sup> rang en LN) et en 2015 (13<sup>ème</sup> rang en HN et 12<sup>ème</sup> rang en LN). Par contre, NERICA 10, une variété à cycle court a connu une tendance inverse, respectivement en HN et LN, en 11<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> rang en 2013, 6<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> rang en 2014 et 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> rang en 2015 (Annexe 2 a).

Deux autres variétés, IAC25 et CNA4136 (Figure 12), ont contribué à cette l'interaction année × génotype (A×G). De manière inattendue, leurs performances ont été irrégulières en 2014 et 2015. En 2014-LN, elles ont produit des rendements en grains inférieurs à ceux attendus de la relation globale observée entre GY en LN et en HN (Figure 12). Inversement, en 2015-LN, elles ont produit des rendements en grains plus élevés que prévu. Cependant, WAB880 et 126C409, les deux variétés les plus performantes en moyenne, se classent parmi les variétés les plus performantes quelle que soit l'année et le niveau d'azote. La variété WAB880 a été classée au 5<sup>ème</sup> rang en 2013-HN, au 3<sup>ème</sup> rang en 2013-LN et au 1<sup>er</sup> rang dans toutes les autres combinaisons de traitements année × niveau d'azote (A×N) (Figure 12). La variété

<sup>38</sup> Faible niveau d'azote

<sup>39</sup> Fort niveau d'azote



126C409 est classée au 1<sup>er</sup> rang en 2013-HN, au 2<sup>ème</sup> rang en 2013-LN, 2014-HN et 2014-LN, au 4<sup>ème</sup> rang en 2015-HN et au 7<sup>ème</sup> rang en 2015-LN (Annexe 2a).

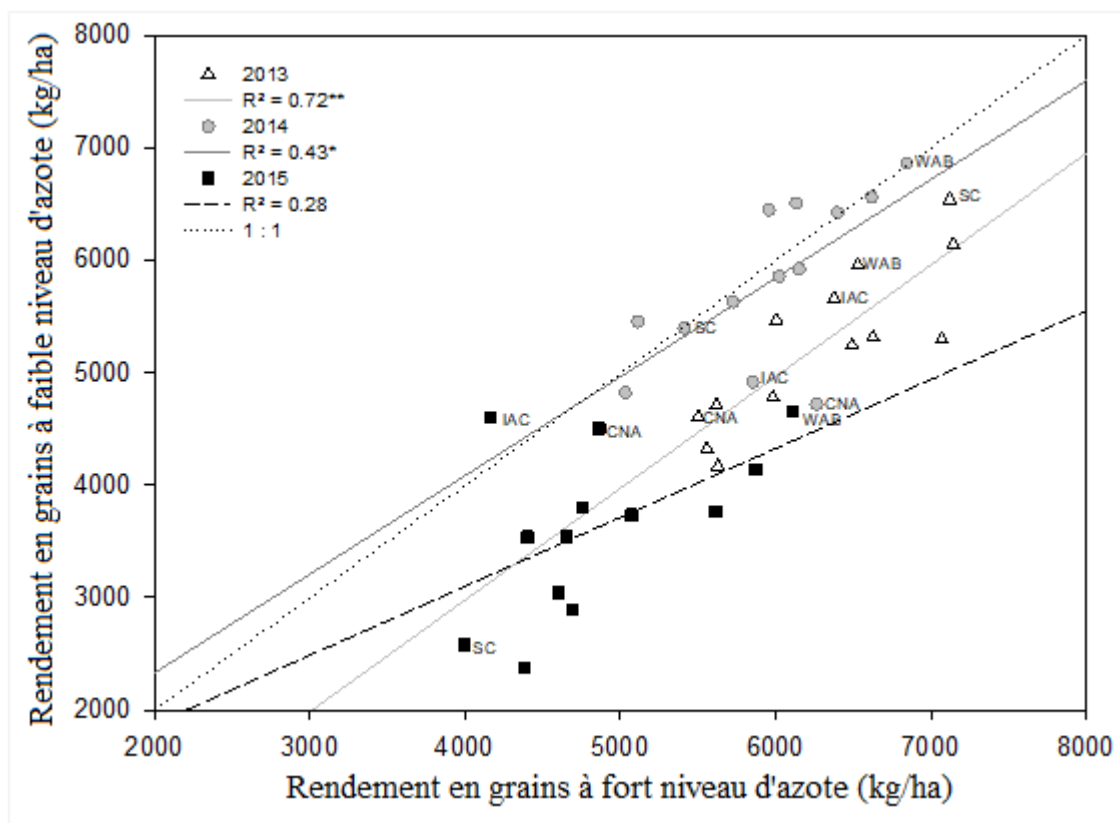


Figure 12: Relation entre rendement en grains obtenus à faible et à fort niveau d'azote  
Abréviation pour les variétés: CNA = CNA4136; IAC = IAC25; WAB = WAB880; SC = SCRID195

### III.2. Effet de l'application de l'engrais azoté

L'efficacité agronomique des engrais azotés (AEN) appliqués sous forme d'urée (90 kg/ha de N en 2013 et 2014 et 120 kg/ha de N en 2015) a été faible. La moyenne de l'AEN était de 11,5 kg/kg N, 1,71 kg/kg N et de 10,25 kg/kg N en 2013, 2014 et 2015, respectivement. En 2014, la différence entre HN et LN est particulièrement faible (Tableau 6); le rendement en grains (GY) en HN n'augmente que de 3% seulement. En HN, GY a augmenté de 20% en 2013 et de 34% en 2015.

Les caractères les plus affectés positivement par l'application de l'azote sont liés à l'absorption de l'azote et à la production de biomasse. A la floraison, l'azote absorbé par la plante à floraison (FLNUP) a augmenté de 64% en 2013 et de 63% en 2015, correspondant respectivement à 56,05 kg/ha (62% de l'azote appliqué) et à 50,46 kg/ha (42% de l'azote appliqué) et de 15% en 2014, correspondant à 15,54 kg/ha ou 17% de l'azote appliqué. Ces augmentations résultent de l'augmentation combinée de la biomasse à floraison (BFL) et la teneur en azote de la plante à floraison (FLNC). BFL a augmenté de 38%, 11% et 31%, tandis que FLNC a augmenté de 19%, 4% et 26% en 2013, 2014 et 2015, respectivement.

Tableau 6: Valeur phénotypique moyenne, corrélation et pourcentage de variation entre les deux niveaux d'azote des 21 caractères agronomiques mesurés sur le riz pluvial

Caractère	2013				2014				2015				Unité
	LN	HN	corr <sup>1</sup>	%var <sup>2</sup>	LN	HN	corr <sup>1</sup>	%var <sup>2</sup>	LN	HN	corr <sup>1</sup>	%var <sup>2</sup>	
FLNUP	87,98	144,03	0,66 *	64% *	106,05	121,59	0,58*	15%	79,52	129,98	0,55*	63% *	kg/ha
TNUP	96,32	137,83	0,68*	43% *	117,32	129,55	0,49 ns	10% *	65,03	107,17	0,19 ns	65% *	kg/ha
BFL	7477,24	10291,7	0,87*	38% *	7313,33	8138,35	0,91*	11% *	5653,29	7398,85	0,73*	31% *	kg/ha
LAI	3,57	4,88	0,86*	37% *	3,03	3,62	0,88*	19% *	2,58	4,19	0,70*	62% *	m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>
SY	5181,7	6770,92	0,93*	31% *	4721,2	5358,63	0,73*	14% *	3521,08	4962,93	0,46	41% *	kg/ha
GY	5246,97	6282,29	0,85*	20% *	5810,3	5964,49	0,66*	3% ns	3629,15	4859,73	0,53 ns	34% *	kg/ha
FLNC	1,2	1,43	0,92*	19% *	1,47	1,53	0,95*	4% *	1,4	1,76	0,62*	26% *	%
GNC	1,26	1,48	0,56*	17% *	1,46	1,52	0,8*	4% *	1,18	1,45	0,38 ns	23% *	%
SNC	0,57	0,66	0,27 ns	16% *	0,69	0,73	0,11 ns	6% *	0,63	0,73	-0,1 ns	16% *	%
PANM2	273,61	312,5	0,91*	14% *	237,61	268,27	0,79*	13% *	210,79	277,81	0,78*	32% *	-
SPIPAN	69,67	78,73	0,99*	13% *	100,15	96,98	0,89*	-3% ns	75,12	83,71	0,80*	11% *	-
DFTL	80	82	0,97*	2% *	95	96	0,98*	1% *	93	93	0,97*	0% ns	jours
NHI	0,69	0,68	0,78*	-1% *	0,72	0,7	0,72*	-3% *	0,65	0,66	0,81*	2% ns	-
TGW	31,84	30,94	0,97*	-3% *	28,42	28,1	0,98*	-1% ns	27,55	27,12	0,98*	-2% *	g
HI	0,5	0,48	0,94*	-4% *	0,55	0,53	0,9*	-4% *	0,5	0,49	0,87*	-2% *	-
FG	89,51	85,9	0,8*	-4% *	88,52	85,22	0,86*	-4% *	84,02	78,85	0,73*	-6% *	%
NUPE	0,71	0,61	0,66*	-14% *	0,73	0,52	0,51 ns	-29% *	0,68	0,5	0,17	-26% *	kg N/kg N
NUTE	55,07	46,01	0,54 ns	-16% *	49,63	46,17	0,52 ns	-7% *	56,03	45,68	0,56*	-18% *	kg grain/kg N
NUE	38,75	27,93	0,85*	-28% *	36,06	23,73	0,67*	-34% *	37,67	22,46	0,51 ns	-40% *	kg grain/kg N
POSTFLNUP	8,35	-6,2	0,3 ns		11,27	7,96	0,71*		-14,49	-22,8	0,44 ns		kg/ha
AEN		11,50				1,71				10,25			kg grain/kgN

<sup>1</sup> Coefficient de corrélation de Pearson: significatif (\*) ou non significatif (ns) au seuil de 5%

<sup>2</sup> Variation entre LN et HN calculée en pourcentage par rapport à LN: significatif (\*) ou non significatif (ns) au seuil de 5%

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

À la récolte, l'azote total absorbé par la plante à maturité a augmenté de 43%, 10% et 65% en 2013, 2014 et 2015, respectivement. Ceci résulte de la combinaison de l'augmentation du rendement en grains, du rendement en pailles, de la teneur en azote des grains et de la teneur en azote des pailles. SY<sup>40</sup> a augmenté de 31%, 14% et 41% en 2013, 2014 et 2015, respectivement. Nous avons observé des augmentations de la même ampleur en HN<sup>41</sup> pour GNC<sup>42</sup> (17%, 4% et 23%) et SNC (16%, 6% et 16%) en 2013, 2014 et 2015, respectivement. À la récolte, la biomasse totale (GY + SY) a augmenté de 25%, 7% et 37% en 2013, 2014 et 2015, respectivement (Tableau 6).

Le nombre de panicules par mètre carré (PANM2) est la composante de rendement la plus sensible à la fertilisation azotée, avec une augmentation de 14%, 13% et 32% en 2013, 2014 et 2015, respectivement. Le nombre d'épillets par panicules (SPIPAN) a augmenté modérément, soit de 13% en 2013 et de 11% en 2015, mais a légèrement diminué (-3%) en 2014 (Tableau 6). À l'inverse, le poids de mille grains (TGW) a diminué de 3%, 1% et 2% et le pourcentage de grains pleins (FG) a diminué de 4%, 4% et 6% en 2013, 2014 et 2015, respectivement. De même, l'indice de récolte (HI) a diminué en HN (-4%, -4% et -2% en 2013, 2014 et 2015, respectivement).

NUE et ses composantes ont considérablement diminué en HN par rapport à LN. NUE a diminué de 28%, 34% et 40%, respectivement, en 2013, 2014 et 2015. De même, NUPE a diminué de 14%, 29% et 26%, et NUTE a diminué de 16%, 7% et 18% en 2013, 2014 et 2015, respectivement (Tableau 6). L'azote absorbé par la plante après la floraison (POSTFLNUP) est négatif en 2013 et 2015 en HN et en 2015 en LN, ce qui suggère qu'une certaine quantité d'azote a été perdue entre la floraison et la récolte, bien qu'il y ait eu une nette augmentation de la biomasse totale au cours de cette période. Cependant, il est intéressant de noter que POSTFLNUP (qui représente un compromis entre la perte et l'absorption de l'azote après la floraison dans nos conditions expérimentales) a été plus élevé en LN qu'en HN.

### III.3. Interaction entre génotype et niveau d'azote

Le niveau d'interaction génotype × niveau d'azote (G×N) est faible. En accord avec l'absence d'interaction génotype × niveau d'azote pour GY, l'analyse de variance combinée n'a montré aucune interaction G×N significative (au seuil de 5%) pour aucune des quatre composantes de GY (PANM2, SPIPAN, FG, TGW; Tableau 5). Les corrélations entre HN et LN pour ces composantes étaient toujours étroites et hautement significatives:  $r = 0,91, 0,79$  et  $0,78$  pour PANM2 en 2013, 2014 et 2015, respectivement;  $r = 0,99, 0,89$  et  $0,80$  pour SPIPAN;  $r = 0,80, 0,86$  et  $0,73$  pour FG et  $r = 0,97, 0,98$  et  $0,98$

---

<sup>40</sup> Rendement en pailles

<sup>41</sup> Fort niveau d'azote

<sup>42</sup> Teneur en azote des grains

pour TGW<sup>43</sup> (Tableau 6). Les variétés PCT11 et 126C409 présentaient systématiquement le nombre le plus élevé de PANM2<sup>44</sup> pour les trois années et les deux niveaux d'azote (Annexe 2a). La variété SEBOTA402 a donné constamment le nombre le plus élevé de SPIPAN<sup>45</sup> quel que soit l'année ou le niveau d'azote. La variété PRIMAVERA a également un nombre élevé de SPIPAN, sauf en 2015, pour des raisons inconnues (Annexe 2a). Quatre variétés B22, CNA4136, F159 et IAC25 ont présenté de manière constante le TGW le plus élevé quel que soit l'année et le niveau d'azote. B22 et CNA4136 présentent aussi presque systématiquement le FG le plus élevé pour les trois années et les deux niveaux d'azote (Annexe 2a). WAB880, la variété offrant le meilleur rendement en grains, ne se présente pas parmi les meilleures sur chacune des composantes du rendement, ce qui indique que le meilleur rendement en grains est plutôt un compromis entre toutes les composantes du rendement. Néanmoins, une interaction génotype × niveau d'azote significative (au seuil de 5%) a été trouvée pour NUTE, principalement à cause de WAB880. Cette variété, offrant le meilleur rendement en grains à la fois en LN<sup>46</sup> et HN<sup>47</sup>, présente constamment un NUTE<sup>48</sup> élevé en LN, au-delà de celui établi par la relation globale entre LN et HN (données non présentées). Il convient de noter que WAB880 présente également la teneur en azote des pailles (SNC) la plus faible en LN (la plus faible en 2013 et 2014 et la deuxième plus faible en 2015 avec 0,42%, 0,46% et 0,46%, respectivement) (Annexe 2a).

#### III.4. Contribution de ses composantes (NUPE et NUTE) à la variation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote

Le NUE des 13 variétés varie de 24,60 à 31,86 kg de grains/kg N en HN et de 30,55 à 47,08 kg de grains/kg N en LN en 2013 ; de 19,94 à 27,26 kg de grains/kg N en HN et de 29,29 à 42,44 kg de grains/kg N en LN en 2014 ; de 18,43 à 28,32 kg de grains/kg N en HN et de 24,06 à 48,30 kg de grains/kg N en LN en 2015. La variabilité observée est plus grande en LN qu'en HN.

Il existe une corrélation positive significative (de  $r = 0,56$  à  $r = 0,92$  ;  $\alpha=5\%$ ) entre NUE et NUPE des variétés pour toutes les années et les niveaux d'azote LN et HN (Figure 13 a). Des corrélations positives significatives ( $\alpha=5\%$ ) ont également été observées entre NUE et NUTE en 2013-HN ( $r = 0,67$ ), 2014-HN ( $r = 0,63$ ) et 2015-LN ( $r = 0,57$ ) (Figure 13b).

---

<sup>43</sup> Poids de mille grains

<sup>44</sup> Nombre de panicules par mètre carré

<sup>45</sup> Nombre d'épillets par panicule

<sup>46</sup> Faible niveau d'azote

<sup>47</sup> Fort niveau d'azote

<sup>48</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

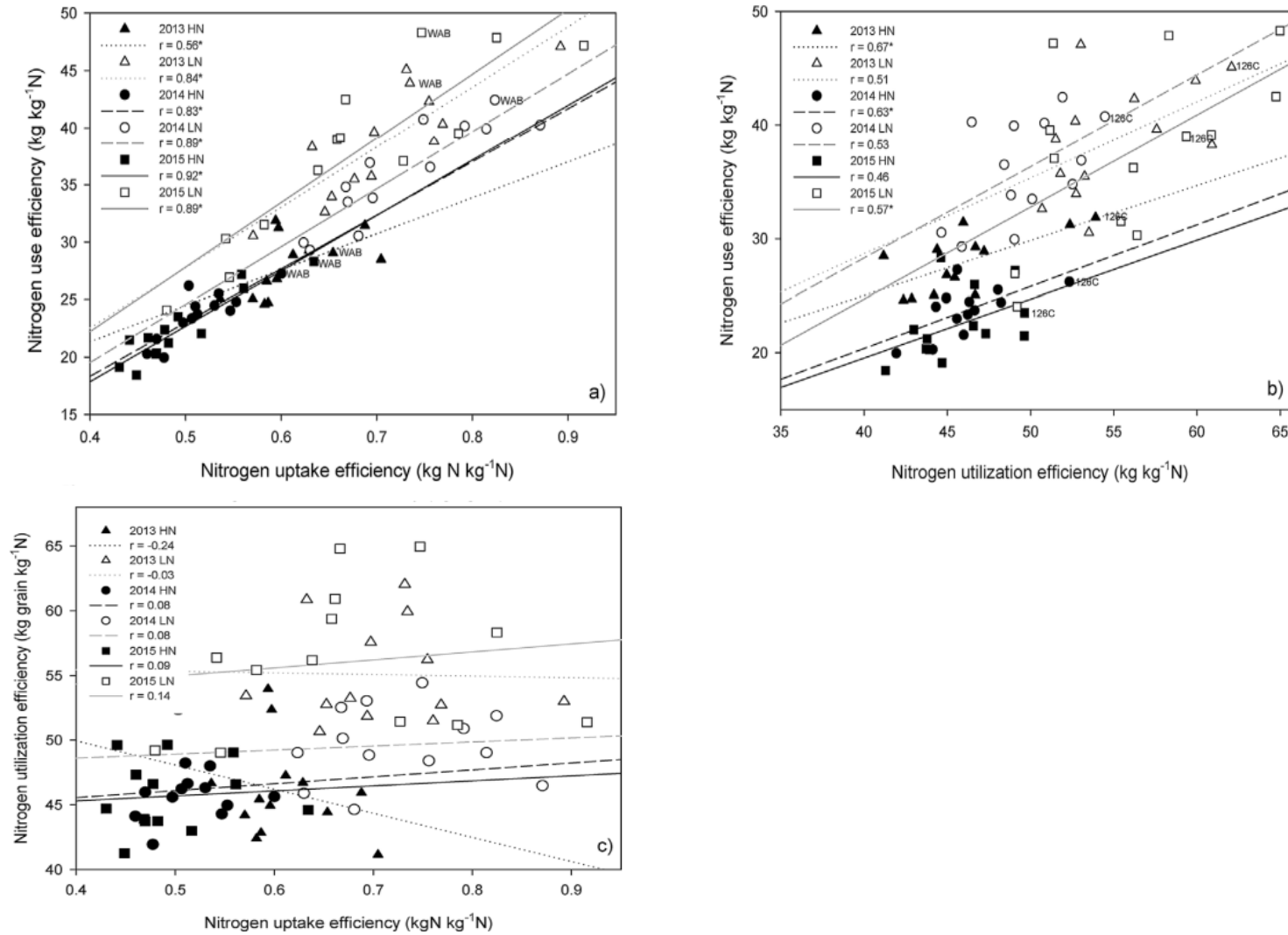


Figure 13: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et l'efficacité d'absorption de l'azote (NUPE) (a); entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) et l'efficacité de conversion de l'azote (NUTE) (b) et entre NUPE et NUTE (c) pour les combinaisons de traitements de trois années × deux niveaux d'azote pour 13 variétés de riz pluvial

\* indique une corrélation significative à  $p < 0,05$

Abréviations pour les variétés : 126C = 126-C409-8-1-2; WAB = WAB 880-1-32- 1-1-P2-HB-1

La variation de NUPE <sup>49</sup> explique mieux la variation de NUE que NUTE <sup>50</sup> sauf en 2013 en HN (tableau 7). Les corrélations entre NUPE et NUTE varient de 0,03 à 0,24 et ne sont jamais significatives (Figure 13c).

Le NUE moyen de la variété WAB880 est le plus élevé. Cette variété est classée au 5<sup>ème</sup> rang en 2013-HN (NUE = 29,04), au 3<sup>ème</sup> rang en 2013-LN (NUE = 43,92) et au 1<sup>er</sup> rang dans toutes les autres combinaisons de traitements année × niveau d'azote. Elle affiche également le NUPE moyen le plus élevé en HN et le deuxième le plus élevé en LN (Annexe 2a). Cependant, les deux traitements azotés ont affecté le NUTE de WAB880 différemment car WAB880 s'est classé aux 3<sup>ème</sup> rang, 4<sup>ème</sup> rang et 1<sup>er</sup> rang en LN et seulement aux 9<sup>ème</sup> rang, 8<sup>ème</sup> rang et 8<sup>ème</sup> rang en NH, en 2013, 2014 et 2015, respectivement.

La relation entre NUPE et NUTE est différente pour la deuxième variété qui a une meilleure NUE, 126C409. Elle affiche la meilleure NUTE moyen et se classe au 1<sup>er</sup> rang pour NUTE dans toutes les combinaisons de traitements année × niveau d'azote, sauf en 2015-LN où elle occupe le 4<sup>ème</sup> rang (Figure 13b; Annexe 2a). Cependant, 126C409 est moins efficace pour NUPE et se classe respectivement aux 8<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> rangs en 2013-HN, 2013-LN, 2014-HN, 2014-LN, 2015-HN et 2015-LN (Annexe 2a).

Tableau 7: Contribution de l'efficacité d'absorption de l'azote (NUPE) et de l'efficacité de conversion de l'azote (NUTE) à la somme des carrés de l'efficacité de la conversion de l'azote (NUE) sur 13 variétés de riz pluvial, par niveau d'azote et par année

Caractère résultant		2013		2014		2015	
		HN	LN	HN	LN	HN	LN
Log (NUE)	Log (NUPE)	0,34	0,71	0,69	0,79	0,83	0,83
	Log (NUTE)	0,65	0,28	0,30	0,20	0,16	0,17

Log : logarithme népérien

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

### III.5. Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et les autres caractères agronomiques

Il n'y a pas de corrélation significative ( $\alpha=5\%$ ) entre NUE et DTFL <sup>51</sup> pour aucune des combinaisons de traitements année × niveau d'azote (Figure 14; Annexe 2b). Néanmoins, la relation a évolué légèrement de positive en 2013 ( $r = 0,18$  en HN et  $r = 0,06$  en LN) à négative en 2014 ( $r = -0,36$  en HN et  $r = -0,48$  en

<sup>49</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>50</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

<sup>51</sup> Date de floraison

LN<sup>52</sup>) et en 2015 ( $r = -0,51$  en HN et  $r = -0,46$  en LN). À la floraison, il n'y a pas de corrélation significative entre NUE et BFL<sup>53</sup> ( $r$  varie de  $-0,32$  à  $0,24$ ), ni entre NUE et LAI<sup>54</sup> ( $r$  varie de  $-0,43$  à  $0,22$ ) pour aucune des combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote (Figure 14). NUE n'est pas significativement corrélée à FLNC<sup>55</sup> sauf en 2015-HN ( $r = 0,63$ ; Figure 15; Annexe 2b). La corrélation entre NUE et FLNUP<sup>56</sup> n'est significative qu'en 2013-LN ( $r = 0,66$ ) (Figure 15).

À maturité, il n'y a pas de corrélation significative entre NUE et SY<sup>57</sup> sauf en 2015-LN ( $r = 0,56$ ). NUE est systématiquement corrélée positivement avec HI<sup>58</sup> (les valeurs de  $r$  varie de  $0,39$  à  $0,88$ ) et ces relations sont significatives en 2014 et 2015 en HN et LN (Figure 14, Annexe 2b). En ce qui concerne les composantes du rendement, aucune corrélation significative n'a été constatée entre NUE et SPIPAN<sup>59</sup> ( $r$  allant de  $-0,05$  à  $0,48$ ), ni entre NUE et TGW<sup>60</sup> ( $r$  allant de  $-0,30$  à  $0,37$ ), quelle que soit l'année et le niveau d'azote. Il n'y a pas de corrélation significative ( $\alpha=5\%$ ) entre NUE et FG<sup>61</sup> pour aucune des combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote sauf en 2015-LN ( $r = 0,57$ ).

À l'inverse, NUE est systématiquement corrélée positivement avec PANM2<sup>62</sup> ( $r$  varie de  $0,50$  à  $0,73$ ) et ces corrélations sont statistiquement significatives ( $\alpha=5\%$ ) en 2013 et 2014 en HN et LN (Figure 14, Annexe 2b). Les courbes représentant les corrélations entre NUE et les caractères agronomiques (Figure 14 et figure 15) sont différentes d'une année à l'autre, ce qui reflète la plasticité de la contribution des différents caractères agronomiques à NUE. Les deux courbes correspondant aux corrélations en LN et en HN sont apparues plus disjointes en 2015 qu'en 2013 ou 2014. En plus, des corrélations positives et significatives ont été observées entre NUE-LN et NUE-HN en 2013 et 2014 mais pas en 2015 (Tableau 6). Des ajustements plus drastiques peuvent avoir eu lieu en 2015-LN, la condition la plus contraignante.

NUE est significativement corrélée positivement avec TNUP<sup>63</sup> pour toutes les combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote ( $r$  allant de  $0,57$  à  $0,92$ ; Figure 15 ; Annex 2b). NUE est corrélée significativement avec l'azote total des grains mais cette corrélation est non significative entre NUE et l'azote total des pailles quelles que soient les combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote (données non présentées). NUE était corrélée de manière significative et positive avec NHI<sup>64</sup> en 2014 et 2015 en HN et LN et avec POSTFLNUP<sup>65</sup> en LN, en 2014 et 2015 ( $r = 0,67$  et  $r = 0,74$ ; Figure 15; Annexe 2 b).

---

<sup>52</sup> Faible niveau d'azote

<sup>53</sup> Biomasse à floraison

<sup>54</sup> Indice de surface foliaire

<sup>55</sup> Teneur en azote de la plante à floraison

<sup>56</sup> Azote absorbé à floraison

<sup>57</sup> Rendement en pailles

<sup>58</sup> Indice de récolte

<sup>59</sup> Nombre d'épillets/panicule

<sup>60</sup> Poids de mille grains

<sup>61</sup> Pourcentage de grains pleins

<sup>62</sup> Nombre de panicules par mètre carré

<sup>63</sup> Azote total absorbé par la plante à maturité

<sup>64</sup> Indice de récolte azoté

<sup>65</sup> Azote absorbé par la plante après la floraison

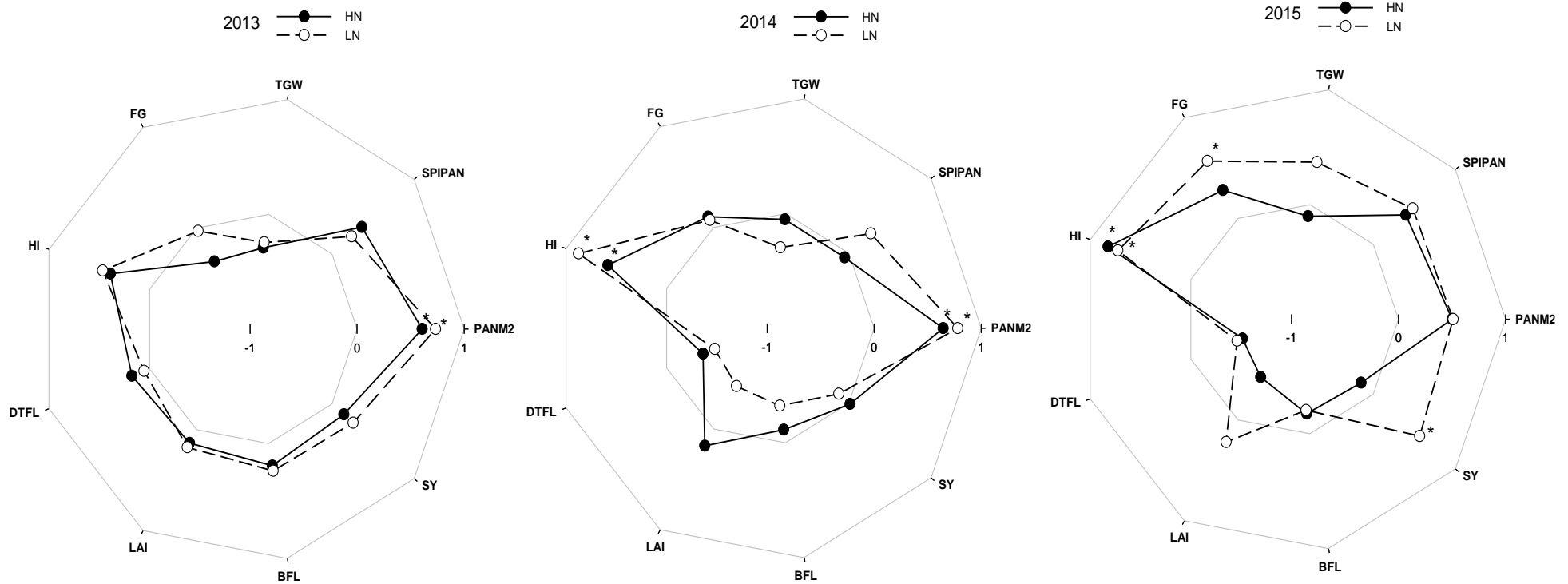


Figure 14: Corrélacion de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) avec chacun des caractères agronomiques (poids de mille grains (TGW), nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), nombre de panicules par mètre carré (PANM2), rendement en pailles (SY), biomasse à floraison (BFL), indice de surface foliaire (LAI), date de floraison (DTFL), indice de récolte (HI), pourcentage de grains pleins (FG)) du riz pluvial, par année et niveau d'azote

\* : corrélation significative au seuil de  $\alpha=5\%$   
 LN : faible niveau d'azote  
 HN : fort niveau d'azote



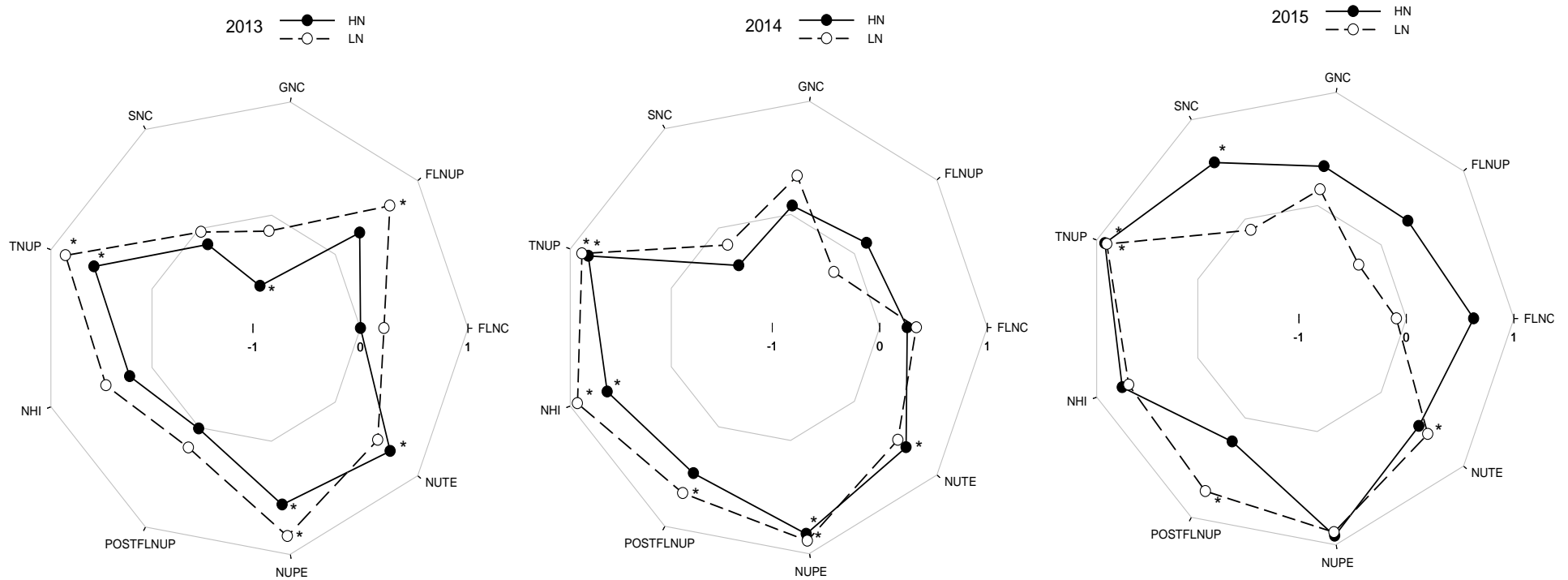


Figure 15: Corrélation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) avec chacun des caractères agronomiques (teneur en azote des grains (GNC), azote absorbé à floraison (FLNUP), teneur en azote de la plante à floraison (FLNC), efficacité de conversion de l'azote (NUTE), efficacité d'absorption de l'azote (NUPE), azote absorbé à post-floraison (POSTFLNUP), indice de récolte azoté (NHI), azote total absorbé par la plante (TNUP), teneur en azote des pailles (SNC)) du riz pluvial, par année et niveau d'azote

\* : corrélation significative au seuil de  $\alpha=5\%$

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

Une relation négative significative ( $\alpha=5\%$ ) entre NUE et GNC<sup>66</sup> n'est observée qu'en 2013-HN, correspondant aux valeurs les plus élevées de GNC (Figure 15; Annexe 2b). Pour toutes les autres combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote, NUE et GNC ne sont pas corrélés de manière significative, avec  $r$  allant de -0,14 à 0,35 (la relation est exactement la même entre GY<sup>67</sup> et GNC). Bien que NUTE<sup>68</sup> ait toujours été corrélé négativement avec GNC pour toutes les combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote, les corrélations ne sont pas significatives qu'en 2013-HN et 2014-LN ( $r=-0,6$  et  $r=-0,56$  respectivement). NUE est significativement corrélée avec SNC seulement en 2015-HN ( $r = 0,57$ ; Figure 15).

#### IV. Discussions

Un effet très significatif des facteurs année, année  $\times$  génotype et année  $\times$  niveau d'azote a été observé pour presque tous les caractères lors des trois campagnes d'évaluation des 13 variétés de riz pluvial à deux niveaux d'azote. Cet effet de l'année est principalement attribué à des différences significatives dans la distribution de la pluviométrie qui a probablement entraîné des différences dans la dynamique de la disponibilité de l'azote pour la culture de riz. Pour les cultures céréalières, l'efficacité agronomique de l'azote apporté (AEN), qui correspond à l'augmentation du rendement en grains due à l'application de l'azote, varie de 10 à 30 kg de grains/ kg d'azote apporté (Dobermann, 2005). Ladha et al. (2005) ont rapporté des valeurs de AEN<sup>69</sup> de 24,2, 22,0 et 18,1 kg grains /kg N pour le maïs, le riz et le blé, respectivement, après une méta-analyse de 93 études publiées. Dans la présente expérimentation, des AEN beaucoup plus faibles (11,5, 1,71 et 10,25 kg grains/kg N en 2013, 2014 et 2015, respectivement) sont observées. C'est à peine rentable car l'augmentation du rendement en grains des agriculteurs représente entre 0,2 et 1,6 fois le coût de l'urée appliquée selon un calcul basé sur le prix du paddy dans les villages en 2016. Saito et al. (2006) ont également constaté des valeurs d'AEN faibles, 2,8 et 11,6 kg grains/kg d'azote apporté, pour trois variétés de riz traditionnelles et trois variétés améliorées de riz dans le nord du Laos, respectivement. Ces auteurs ont rapporté que l'application de l'azote n'était rentable que lorsque des variétés améliorées étaient utilisées. Nous avons utilisé l'urée comme source d'azote dans notre expérimentation. L'urée est susceptible de se volatiliser. Bien que des pertes par volatilisation plus faibles soient attendues dans les sols acides, comme dans notre cas, elles pourraient ne pas être négligeables (Whitehead et Raistrick, 1990). L'urée est également susceptible d'être lessivée, mais beaucoup moins que les engrais contenant du  $\text{NO}_3^-$  (Ladha et al., 2005). La faible AEN observée dans cette expérimentation peut résulter de la combinaison de perte

---

<sup>66</sup> Teneur en azote des grains

<sup>67</sup> Rendement en grains

<sup>68</sup> Efficacité de conversion de l'azote

<sup>69</sup> Efficacité agronomique de l'azote apporté

d'azote par lixiviation, par ruissellement, voire par volatilisation de l'azote. L'importance relative de ces trois processus de pertes d'azote nécessite donc plus d'investigation. En particulier, en 2015, une grande partie de l'azote aurait pu être perdue par ruissellement ou lixiviation en raison de fortes précipitations, entraînant une absorption plus faible de l'azote par rapport aux autres années. Compte tenu de ces contraintes climatiques, l'efficacité agronomique et économique d'autres formes d'engrais azotés, qui ont des caractéristiques de libération de l'azote plus lentes (Zheng *et al.*, 2017a), devrait être étudiée.

La présente étude a révélé l'existence d'une variabilité génétique significative ( $\alpha=5\%$ ) pour NUE, NUPE<sup>70</sup> et NUTE<sup>71</sup> en HN et LN parmi les 13 variétés représentatives de la diversité génétique du groupe japonica tropical, adaptées à la culture pluviale en moyenne altitude à Madagascar. Elle a également révélé un faible EAN ainsi qu'un faible niveau d'interaction génotype  $\times$  niveau d'azote (G $\times$ N). Ces résultats devraient être approfondis en utilisant des niveaux d'azote plus contrastés et en particulier une condition d'azote faible, plus stressante que celle qui a été testée lors de cette étude (en utilisant moins de fumiers et des rotations sans légumineuses). La variation de NUPE explique davantage la variation de NUE que la variation de NUTE (Figure 15). Il n'y a pas de corrélation entre NUPE et NUTE, que ce soit en HN ou en LN, quelle que soit l'année. Une observation similaire a été observée par Barraclough *et al.* (2010) chez le blé, suggérant qu'il est possible d'améliorer les deux composantes de NUE indépendamment. Les deux meilleures variétés pour NUE et le rendement en grains, WAB880 et 126C409, présentent des caractéristiques complémentaires pour les composantes de NUE. WAB880 a le meilleur NUPE et 126C409, le meilleur NUTE parmi les 13 variétés étudiées. Le croisement de ces deux variétés pourrait ainsi permettre d'obtenir des lignées recombinantes à NUE amélioré. La variété WAB880 est particulièrement intéressante, car elle semble être bien adaptée aux conditions de faible niveau d'azote. En effet, elle présente un NUTE supérieur à celui attendu de la relation globale entre NUTE-LN et NUTE-HN et elle présente aussi le plus faible teneur en azote des pailles parmi les 13 variétés.

Nous n'avons pas observé la relation négative fréquemment rapportée entre NUE et la teneur en azote des grains (Bogard *et al.*, 2010), à l'exception de 2013-HN ( $r = -0,62$ ; Figure 15), qui correspond aux meilleures conditions azotées de toutes les combinaisons de traitements année  $\times$  niveau d'azote (caractérisées par les TNUP<sup>72</sup> et FLNUP<sup>73</sup> moyens les plus élevés). Cependant, NUTE présente constamment une corrélation négative avec la teneur en azote des grains et la teneur en azote des pailles, comme dans d'autres études sur le riz (Tirol-padre *et al.*, 1996; Inthapanya *et al.*, 2000; Koutroubas *et*

<sup>70</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>71</sup> Efficacité de conversion de l'azote

<sup>72</sup> Azote total absorbé par la plante à maturité

<sup>73</sup> Azote absorbé par la plante à floraison

Ntanos, 2003; Wu *et al.*, 2016; Annexe 2b). Dans la présente expérimentation, la teneur en azote des grains varie de 1,14 % à 1,70 % selon les variétés, les niveaux d'azote et les années (Annexe 2b). Ces valeurs sont supérieures aux valeurs de la teneur en azote des grains observées par Tirol-padre *et al.* (1996) sur 180 variétés de riz irrigué étudiées à des niveaux non optimaux d'azote du sol, allant de 0,91% à 1,46%. La teneur en azote des grains de cette étude est aussi légèrement supérieure à la valeur de référence, de 1,0 à 1,5 % d'azote, indiquée par Mae (1997) pour le riz irrigué. De même, elle est supérieure à celle trouvée par Inthapanya *et al.* (2000), allant de 0,75% à 1,05% dans 16 variétés de riz étudiées dans trois sites et deux niveaux d'azote dans des conditions pluviales de bas fond. Chez le blé, Barraclough *et al.* (2010) ont trouvé une relation négative entre le rendement en grains et la teneur en azote des grains, cette relation est plus étroite à des niveaux élevés d'azote appliqués (entre 200 et 350 kg N/ha) qu'à des niveaux faibles (0 et 50 kg N/ha). Cette corrélation négative est cohérente avec celle observée dans 27 environnements étudiés par Bogard *et al.* (2010), mais leur traitement le plus faible en azote était de 60 à 80 kg d'azote appliqué, sans compter l'apport en azote du sol. L'absence de relation négative entre le rendement en grains et la teneur en azote des grains observée dans cette étude en faible niveau d'azote devrait donc permettre l'amélioration du rendement en grains du riz pluvial sans aucun effet négatif sur la qualité du grain.

Après la floraison, le remplissage du grain dépend de deux sources d'azote qui sont l'azote remobilisé à partir des organes végétatifs et l'azote nouvellement absorbé. Dans cette étude, nous voulions mesurer l'azote absorbé par la plante après la floraison (POSTFLNUP) en tant que différence d'absorption d'azote entre la floraison et la maturité, mais des valeurs négatives ont été trouvées (en 2013-HN et 2015 en HN et LN), ce qui suggère qu'une certaine quantité d'azote a été perdue malgré une nette augmentation de la biomasse aérienne totale entre la floraison et la récolte (de + 27% à + 44%, Tableau 6). Bien que les mesures d'absorption d'azote effectuées à la floraison et à la maturité puissent manquer de précision, compte tenu de la faible héritabilité observée, des pertes en azote gazeux de plantes supérieures de 70 kg N/ha ont été documentées en fonction de l'espèce, de la fertilisation, des conditions climatiques et du sol (Francis *et al.*, 1993; Raun et Johnson, 1999). Des pertes d'azote gazeux peuvent survenir au niveau des cultures en raison d'un déséquilibre entre l'accumulation d'azote et l'assimilation de l'azote (Xu *et al.*, 2012). Le riz peut perdre des quantités importantes d'ammoniac au niveau de ses feuilles, en relation avec la photorespiration et l'activité de la glutamine synthase (Kumagai *et al.*, 2011). Jusqu'à 22 kg de pertes d'azote par hectare entre la floraison et la récolte (en 2015-HN) ont été mesurées, ce qui peut être une sous-estimation, car l'azote est également simultanément absorbé. Chez le riz, 60 à 90% du carbone total accumulé dans les panicules lors de la récolte provient de la photosynthèse produite après l'épiaison (Mae, 1997). En revanche, la proportion de l'azote des panicules provenant de l'absorption après la floraison se situe entre 10% et 30% seulement

(Mae, 1997). Cependant, il est à noter que dans cette expérimentation, POSTFLNUP<sup>74</sup> a toujours été plus élevé en LN qu'en HN. De plus, il existe une corrélation positive et significative ( $\alpha=5\%$ ) entre NUE et POSTFLNUP en 2014 et 2015 en LN (Figure 15), ce qui suggère que POSTFLNUP pourrait avoir une importance particulière en LN. Il est nécessaire de poursuivre l'étude sur la contribution relative de l'amélioration de l'efficacité de la remobilisation (grâce à une réduction des pertes d'azote) et/ou de l'amélioration de l'absorption d'azote après la floraison en condition de faible niveau d'azote. Le caractère « stay green » (capacité d'une variété à retarder la sénescence des feuilles et donc à maintenir la photosynthèse pendant le remplissage du grain) a été associé à l'amélioration des rendements du sorgho (Borrell et Hammer, 2000) et du maïs (Mi et al., 2003) en LN. Chez le blé, l'absorption et la remobilisation de l'azote après la floraison contribuent largement au rendement en grains et à la teneur en protéines de grains (Kichey et al., 2007); et le début de la sénescence post-floraison est positivement corrélé au NUTE en LN mais pas en HN (Gaju et al., 2011). La relation entre stay-green et NUE doit donc être étudiée sur le riz pluvial, en particulier dans le cadre de l'adaptation en faible condition azotée. Comme le maintien actif de la photosynthèse pendant le remplissage du grain est antagoniste à la remobilisation de l'azote associée à la sénescence des feuilles, il est donc nécessaire d'étudier la variabilité génétique de l'absorption post-floraison de l'azote dans des conditions limitantes en azote ainsi que la contribution de cette absorption au rendement. La variabilité génétique du système racinaire (architecture et biomasse) et sa relation avec la NUPE sur le riz n'ont fait l'objet que de très peu d'études (Ju et al., 2015; Pan et al., 2016) et nécessitent ainsi des investigations complémentaires, en particulier sur le riz pluvial en condition de faible niveau d'azote. Lorsque les éléments minéraux sont limités, les plantes s'adaptent souvent à ce milieu en allouant une plus grande proportion de leur biomasses au système racinaire (Hermans et al., 2006).

## V. Conclusion partielle du chapitre II

L'objectif de cette étude est d'étudier la variabilité génétique pour le NUE du riz dans un écosystème pluvial et d'identifier les caractères cibles indirects pouvant contribuer à l'amélioration de NUE, en particulier en condition limitée en azote. L'étude a révélé des différences variétales significatives pour NUE qui résultent des compromis complexes entre les composantes du rendement et du NUE et ainsi que des interactions complexes avec les conditions environnementales. Cependant, le nombre de panicules par mètre carré et l'indice de récolte ont été toujours positivement corrélés avec NUE. L'absorption de l'azote post-floraison était également positivement corrélée à NUE, en particulier en condition LN. La sélection directe sur ce caractère peut ne pas être facile dans un programme de sélection classique car il est difficile et coûteux

---

<sup>74</sup> Azote absorbé par la plante après la floraison

à mettre en œuvre sur un grand nombre d'individus. Toutefois, l'identification de nouveaux caractères liés à NUE devrait être utile pour sa dissection génétique (QTL<sup>75</sup>, GWAS<sup>76</sup>, etc.) ou pour le développement d'une sélection génomique pour NUE. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la dynamique de l'azote (absorption d'azote, remobilisation de l'azote, perte d'azote gazeux dans les feuilles) entre la floraison et la récolte afin d'améliorer NUE lorsque la disponibilité en azote est limitée. La variabilité génétique des caractères racinaires en lien avec NUE reste également à explorer.

---

<sup>75</sup> Locus de caractères quantitatifs

<sup>76</sup> Etude d'association pangénomique

**Chapitre III : ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DE  
L'EFFICIENCE DE L'UTILISATION DE L'AZOTE DU RIZ  
PLUVIAL**

## **Chapitre III : ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DE L'EFFICIENCE DE L'UTILISATION DE L'AZOTE DU RIZ PLUVIAL**

### **I. Introduction**

La compréhension de l'efficacité de l'utilisation de l'azote, un caractère quantitatif très complexe, en vue d'obtenir, à long terme, chez le riz pluvial, des variétés plus efficaces dans leur utilisation de l'azote, implique de disséquer ce caractère sur le plan phénotypique et génétique. Ce chapitre est ainsi divisé en deux parties dont une première partie consacrée à la caractérisation phénotypique de NUE ainsi que d'autres caractères agronomiques, qui lui sont liés, à deux niveaux d'azote et une deuxième partie destinée à l'étude d'association pangénomique de ces caractères afin d'identifier les régions chromosomiques impliquées dans leur variation.

### **II. Caractérisation phénotypique du NUE et d'autres caractères agronomiques associés dans un panel de 198 variétés de riz pluvial, à deux niveaux d'azote contrastés**

#### **II.1. Introduction**

L'efficacité de l'utilisation de l'azote est la résultante de l'efficacité d'absorption de l'azote et l'efficacité de l'utilisation ou de la conversion de l'azote. Une variabilité génétique existe pour chacune de ces composantes et cette variabilité change en fonction de la condition azotée du milieu à cause de l'existence d'une interaction génotype  $\times$  niveau de fertilisation azotée. La contribution de ces composantes au NUE est variable en fonction des génotypes et des niveaux d'azote du sol (Rakotoson *et al.*, 2017). Cette partie évalue la variation phénotypique, à deux niveaux contrastés de fertilisation azotée, dans un panel de diversité large de riz pluvial, du NUE, de ses composantes NUPE et NUTE, mais aussi du rendement en grains et ses composantes, de la date de floraison, de la quantité d'azote des grains et pailles et de la quantité totale d'azote absorbé par la plante.

#### **II.2. Matériels et méthodes**

##### **II.2.1. Site expérimental**

L'essai a été conduit à Ivory, dans le Moyen Ouest de Madagascar, 19°33'27 Sud et 46°24'43 Est, à 960 m d'altitude, pendant 2 campagnes du riz (2014-2015, 2015-2016). La campagne s'étend du mois de novembre de l'année 1 jusqu'au mois d'avril de l'année 2. La pluviométrie totale a été de 1612 mm en 2014-2015 et de 1222 mm en 2015-2016 (Figure 16). La moyenne de température pendant la campagne est de 24,6°C en 2014-2015 comme en 2015-2016. Le sol est de type ferrallitique. Une analyse des 20 premiers cm du profil du sol a été effectuée avant la mise en culture au mois de novembre 2014 et celle-ci indique 0,82 g/kg d'azote total, 16,6 g/kg de matières organiques, 0,17 cmolc/kg de K échangeable, 4,47 mg/kg de P Olsen et un pH de 4,98.



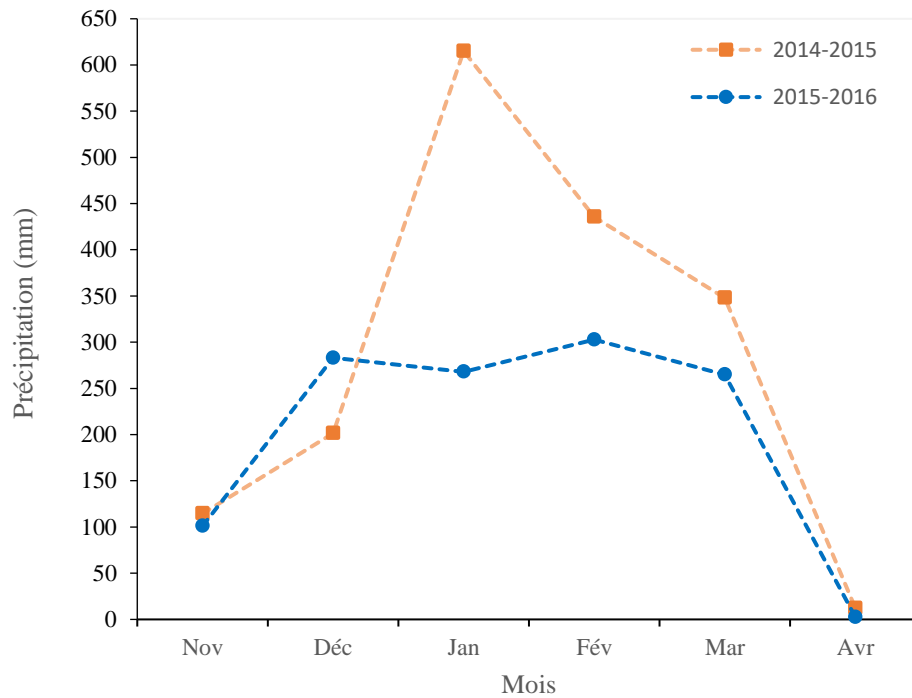


Figure 16: Pluviométrie mensuelle à Ivory pendant les deux campagnes de riz pluvial (2014-2015 et 2015-2016)

Source : Auteur, 2019

### II.2.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est un panel de 198 variétés de riz pluvial, issu d'une collection de variétés utilisées pour les croisements du programme de sélection mené en partenariat à Madagascar par le centre de recherche FOFIFA et le CIRAD. Ces variétés proviennent de différents pays et/ou centres de recherche dont CIAT en Colombie, EMBRAPA au Brésil, CIRAD, Africa Rice en Côte d'Ivoire mais sont aussi issues du programme de création variétale local mené par FOFIFA/CIRAD (Annexe 3).

### II.2.3. Conduite agronomique et niveaux d'azote appliqués

Concernant la préparation des terrains, les parcelles ont été labourées avec une charrue attelée puis affinées manuellement juste avant d'effectuer le semis. La précédente culture lors des deux campagnes est le pois de terre (*Vigna subterranea*). Avant d'effectuer le semis, les semences ont été traitées avec un insecticide systémique composé de 35% d'imidaclopride et de 10% de thiram, à raison de 2,5 g/kg de semences pour protéger les jeunes plants contre les vers blancs. Les semis ont été effectués le 29 novembre 2014 pour la première campagne et le 23 novembre 2015 pour la deuxième campagne, quatre à six graines par poquet ont été semées. Lors du semis, une fumure de fond a été appliquée dans toutes les parcelles dont 5000 kg/ha de fumier, 500 kg/ha de dolomie, 150 kg/ha de triple superphosphate (soit 69 kg/ha de  $P_2O_5$ ) et 130 kg/ha de sulfate de potassium (soit 62,4 kg/ha de  $K_2O$ ). Deux niveaux d'azote ont été appliqués pour tester la réponse des variétés à l'azote dont le niveau faible en azote (LN, « Low Nitrogen »), sans apport

d'azote minéral et le niveau fort en azote (HN, « High Nitrogen ») correspondant à 120 kg/ha d'azote. L'azote a été apporté, sous forme d'urée (46%), de façon fractionnée, en trois apports, à la levée, au début du tallage et au début de la montaison (Tableau 8). Le suivi de l'expérimentation consiste à veiller à ce que les mauvaises herbes ne prolifèrent pas, en effet, des désherbages manuels sont effectués lors de l'apparition des mauvaises herbes. Des traitements fongicides sont aussi effectués 2 fois par semaine dès l'apparition des premiers symptômes de la pyriculariose sur les feuilles, en alternant carbendazime et anthracol, jusqu'à la récolte.

Tableau 8: Calendrier cultural lors des essais sur le riz pluvial à Ivory pendant 2 campagnes : date d'apport d'azote, de floraison et de récolte

Campagne		Apport d'azote			Floraison (moyenne)	Récolte (moyenne)
		1 <sup>er</sup> apport	2 <sup>ème</sup> apport	3 <sup>ème</sup> apport		
2014-2015	Date	29 déc 14	20 jan 15	09 fév 15	04 mar 15	16 avr 15
	Nombre de jours après semis	30	52	72	95	138
2015-2016	Date	22 déc 15	19 jan 16	09 fév 16	20 fév 16	31 mar 16
	Nombre de jours après semis	29	57	78	89	129

#### II.2.4. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un dispositif « alpha plan » avec deux répétitions et 14 blocs par répétition. Un bloc comporte 14 variétés plus 2 variétés témoins (Nerica 4, T1 et WAB 880, T2) répétées systématiquement dans chaque bloc. A l'intérieur de chaque bloc, 2 traitements azotés ont été appliqués : un bloc comporte donc 32 parcelles dont la moitié est sous traitement «HN» et l'autre moitié sous traitement «LN» (Figure 17). Les parcelles LN et HN pour chacune des 16 variétés d'un bloc sont systématiquement situées l'une en face de l'autre. Le dispositif comporte au total 896 parcelles élémentaires (2 répétitions × 14 blocs × 16 variétés × 2 niveaux d'azote). La dimension des parcelles élémentaires n'est pas la même dans les deux répétitions pour des contraintes d'espace. Elles mesurent 4,32m<sup>2</sup> (2,4m × 1,8m) pour la répétition 1 et 2.8m<sup>2</sup> (2m × 1,4m) pour la répétition 2 au cours de la campagne 2014-2015. Pour la campagne 2015-2016, les parcelles élémentaires de la 1<sup>ère</sup> répétition mesurent 2,88m<sup>2</sup> (1,6m × 1,8m) et celles de la 2<sup>ème</sup> répétition, 1,92m<sup>2</sup> (1,6m × 1,2m). A l'intérieur de chaque bloc, un espace de 60 cm sépare les parcelles avec azote des parcelles sans azote. L'écartement entre poquets est de 20 cm × 20 cm. Bien que le nombre de poquets d'une parcelle soit variable d'une répétition à l'autre et d'une campagne à l'autre, lors de la

récolte, ce sont toujours six poquets se trouvant au milieu de chaque parcelle qui ont été récoltés pour les différentes mesures.

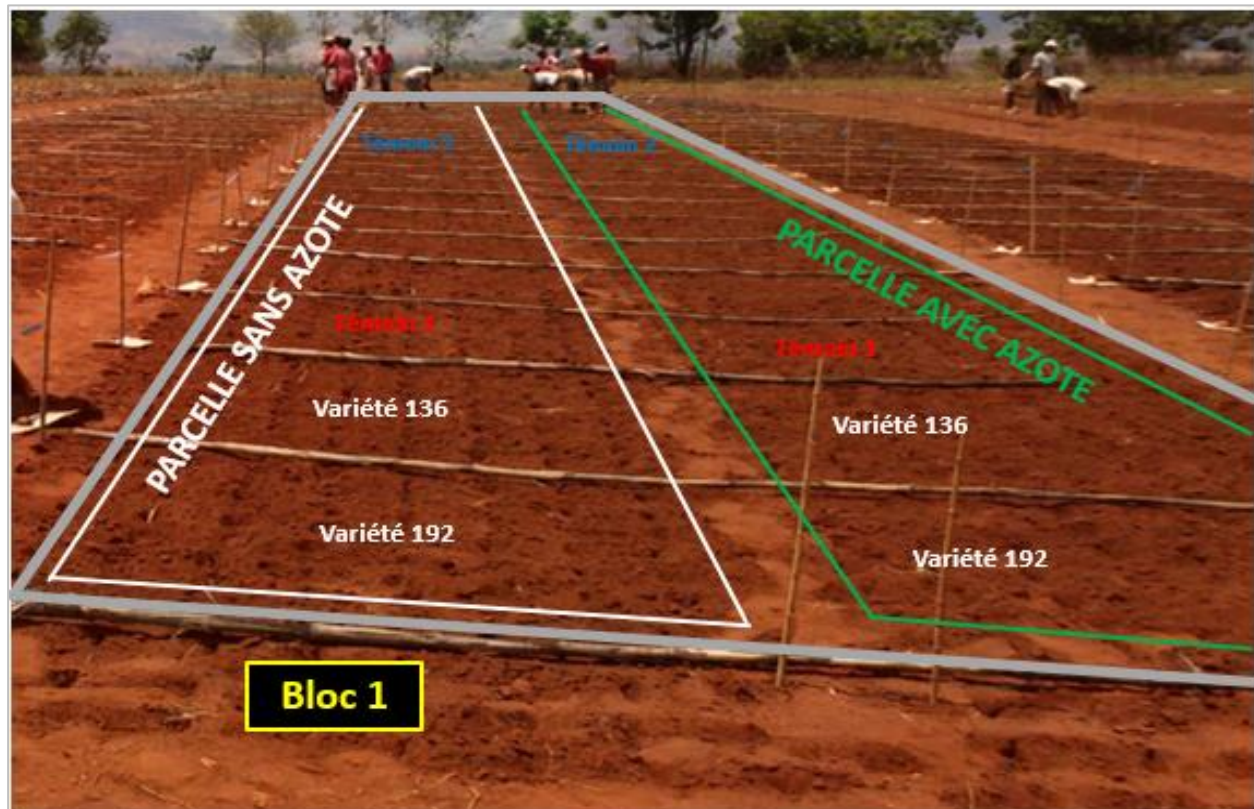
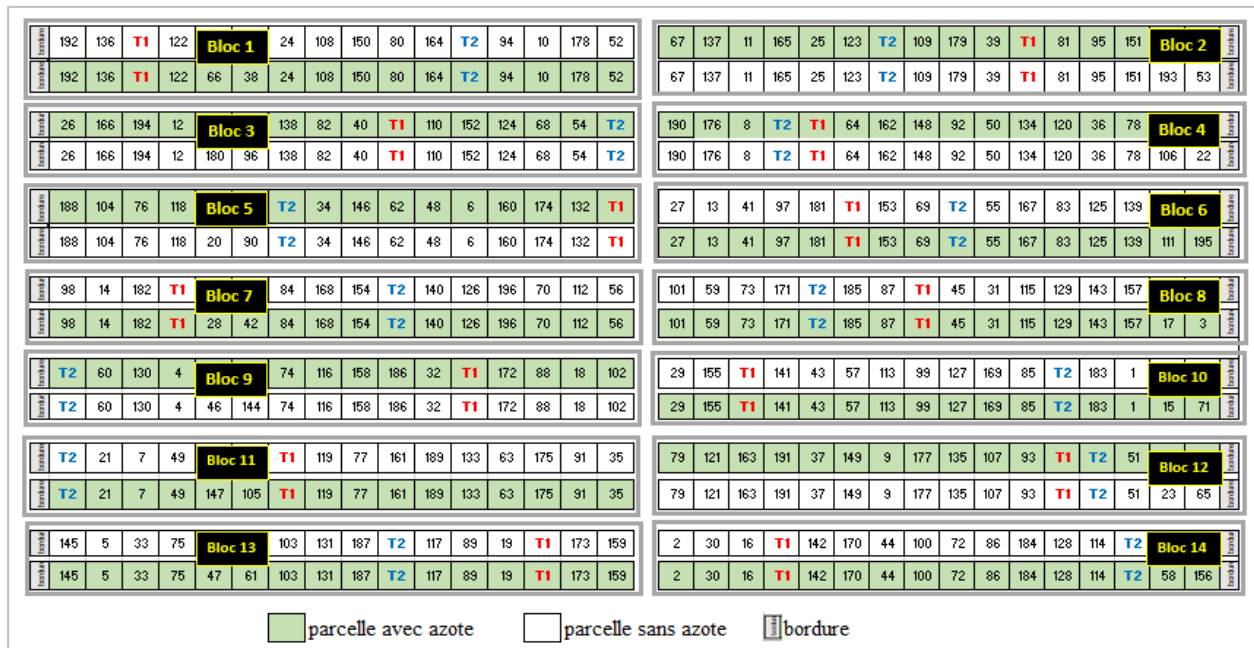


Figure 17: Schéma du dispositif expérimental avec 14 blocs de 16 variétés à deux niveaux d'azote (en haut) et vue détaillée d'un bloc (en bas)

### II.2.5. Mesure de la biomasse, du rendement et ses composantes

A la floraison, la notation de la date de floraison est effectuée pour chaque variété. Cette date correspond au moment où 50% des plantes d'une parcelle élémentaire ont fleuri. La floraison a eu lieu 95 jours après le semis en moyenne en 2014-2015 et 89 jours en 2015-2016 (Tableau 8).

A la récolte, la hauteur de la plante est mesurée sur six poquets (soit 0,24 m<sup>2</sup>) au milieu de chaque parcelle élémentaire. Ces six poquets sont ensuite récoltés pour mesurer les composantes du rendement, la biomasse des grains et la biomasse des pailles. Le nombre de panicules récoltées est compté pour avoir le nombre de panicule par mètre carré. Les échantillons sont ensuite séparés entre grains et pailles. Après séparation, les échantillons de grains et de pailles sont séchés à l'étuve pendant 72h à 60°C pour avoir les rendements en pailles et les rendements en grains. Pour les grains, ceux qui sont pleins sont séparés de ceux qui sont vides. Un sous-échantillon de 200 grains pleins et de 200 grains vides est constitué et pesé afin d'obtenir le poids de mille grains et d'estimer le taux de fertilité, correspondant au pourcentage de grains pleins. Le nombre total de grains (pleins et vides) est utilisé pour avoir le nombre d'épillets par panicule. L'indice de récolte a été calculé par le ratio entre rendement grains et la biomasse totale (Tableau 9).

### II.2.6. Mesure de la teneur en azote

Pour avoir la teneur en azote des grains et des pailles, les échantillons récoltés sont analysés à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge. Pour ce faire, après séchage à l'étuve, ils sont broyés à l'aide d'un broyeur avec un tamis de granulométrie inférieur à la taille de 1mm. Ensuite, chaque échantillon broyé de grains et de pailles a fait l'objet de quatre prises de spectre à l'aide d'un monochromateur Labspec 4, ASD muni d'un « contact probe » et de fibres optiques. La gamme spectrale couverte par le Labspec 4 est comprise entre 1000 nm et 2500 nm (PIR77) avec un pas d'acquisition de 1 nm. Les spectres obtenus ont ensuite été analysés avec le logiciel « Unscrambler ». Une fois les spectres obtenus, ils sont confrontés aux équations de calibration élaborées lors de l'essai préliminaire (Annexe 1b) pour en déduire la teneur en azote dans les grains et les pailles. À partir de ces teneurs, une estimation de l'azote absorbé par la plante est obtenue, ainsi que l'indice de récolte en azote dans les grains (Tableau 9).

### II.2.7. Mesure de l'efficacité de l'utilisation de l'azote

L'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE), l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) et l'efficacité de la conversion de l'azote (NUTE) ont été calculées suivant les formules ci-après :

$$NUE = \frac{GY}{N \text{ disponible dans le sol}} ; NUPE = \frac{TNUP}{N \text{ disponible dans le sol}} ; NUTE = \frac{GY}{TNUP}$$

---

<sup>77</sup> Proche infrarouge

Tableau 9: Différents caractères mesurés sur 198 variétés de riz pluvial

Catégorie des caractères	Caractères	Signification en anglais	Abréviation	Formule	Unité
Paramètres de croissance	Hauteur de la plante	« Plant Height »	PH	-	cm
	Floraison (50% plante)	« Days to flowering »	DTFL	Durée entre le semis et la floraison	j
	Rendement en paille	« Straw Yield »	SY	$10 \times (\text{biomasses des 6 pqt}/0,24)$	kg/ha
Composantes du rendement	Nb panicule/m <sup>2</sup>	«Panicles per m <sup>2</sup> »	PANM2	Nb de panicules dans 6 pqt/0,24	-
	Nb épillets/panicule	«Spikelets per panicle»	SIPAN	Nb épillets dans 6 pqt /nb panicule dans 6 pqt	-
	Fertilité	«Filled Grain»	FG	$100 \times (\text{nb grain plein}/\text{nb total de grain})$	%
	Poids de mille grains	«Thousand Grain Weight»	TGW	Poids de 200 grains pleins $\times 5$	g
	Rendement en grain	«Grain Yield»	GY	$\text{PANM2} \times \text{SIPAN} \times \text{FG} \times \text{TGW} \times 10$	kg/ha
	Indice de récolte	«Harvest Index»	HI	$\text{GY} / (\text{GY} + \text{SY})$	-
Caractères liés à l'azote	Efficacité de l'utilisation de l'azote	«Nitrogen Use efficiency»	NUE	$\text{GY} / \text{N disponible dans le sol}$	kg grain /kgN
	Efficacité de l'absorption de l'azote	«Nitrogen Uptake efficiency»	NUPE	$\text{TNUP} / \text{N disponible dans le sol}$	kg N/kgN
	Efficacité de la conversion de l'azote	«Nitrogen Utilization efficiency»	NUTE	$\text{GY} / \text{TNUP}$	kg grain /kgN
	Indice de récolte azoté	«Nitrogen harvest index»	NHI	$\text{GNC} \times (\text{GY} / \text{TNUP})$	-
	Teneur en azote des grains	«Grain N concentration»	GNC	Concentration d'N dans les grains dans 6 pqt	%
	Teneur en azote des pailles	«Straw N concentration»	SNC	Concentration d'N dans les pailles dans 6 pqt	%
	Azote total absorbé par la plante à maturité	«Total N uptake»	TNUP	$(\text{GNC} \times \text{GY}) + (\text{SNC} \times \text{SY})$	kg/ha

pqt : poquet  
 nb : nombre  
 N : azote

Où TNUP est l'azote total absorbé par la plante à maturité, GY est le rendement en grains et N disponible dans le sol a été estimé, par bloc, comme la valeur maximale de l'azote absorbé par la plante (TNUP) dans les parcelles sans azote (LN).

## II.2.8. Analyses statistiques

L'analyse de la variance est effectuée à l'aide du logiciel SAS/STAT (version 9.4) utilisant un modèle linéaire mixte (proc mixed). Les facteurs de variations sont l'année, la répétition, le niveau d'azote et le bloc (qui sont tous en effets fixes) et les génotypes et l'interaction entre génotype × niveau d'azote (qui sont en effets aléatoires). Voici le modèle statistique utilisé :

$$Y_{ijklm} = \mu + g_i + n_j + a_k + r_{l(k)} + b_{m(k,l)} + g_i n_j + e_{ijklm}$$

Où  $Y_{ijklm}$  : la réponse de  $i^{\text{ème}}$  variété dans le  $m^{\text{ème}}$  bloc du  $l^{\text{ème}}$  répétition à  $k^{\text{ème}}$  année au  $j^{\text{ème}}$  niveau d'azote,

$\mu$  : moyenne générale,

$g_i$  : effet des génotypes ( $i$  varie de 1 à 198),

$n_j$  : effet du niveau d'azote ( $j$  varie de 1 à 2),

$a_k$  : effet de l'année ( $k$  varie de 1 à 2),

$r_{l(k)}$  : effet de la répétition par année ( $l$  varie de 1 à 2),

$b_{m(k,l)}$  : effet du bloc dans la répétition par année ( $m$  varie de 1 à 14),

$g_i n_j$  : interaction génotype × niveau d'azote,

$e_{ijklm}$  : résidus.

Une méthode d'estimation des effets aléatoires (interaction génotype × azote, génotype) est effectuée à l'aide du BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) qui est obtenu après l'analyse de variance par le modèle mixte. Pour chaque caractère, une estimation de la valeur moyenne de chaque génotype, similaire à la moyenne génotypique dans les effets fixes, est obtenue et utilisée pour la suite des analyses. En effet, pour chaque niveau d'azote, chaque génotype a sa propre valeur moyenne qui reflète sa performance face à cet environnement, compte tenu de tous les facteurs mis en jeu.

Une estimation de l'héritabilité à sens large ( $H^2$ ) des caractères a été calculée pour voir si le caractère est fortement héritable. Pour chaque niveau d'azote, une analyse de la variance a été calculée sur SAS/STAT 9.4 (proc varcomp) à l'aide de la méthode de maximum de vraisemblance restreinte (REML) pour décomposer les variances dues aux variétés par rapport à la variance totale. Dans le modèle, les facteurs « année » et « répétition » sont en effet fixes; et « variété » et les autres facteurs, ainsi que leur interaction sont en aléatoires.

$$H^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P$$

$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_I/n + \sigma^2_E /nr$ .  $\sigma^2_G$  : variance génotypique.  $\sigma^2_I$  : variance de l'interaction.

$\sigma^2_E$  : variance de l'erreur. n : nombre d'année et r : nombre de répétition.

Une analyse de la corrélation entre les variables a été aussi effectuée à l'aide du logiciel R avec le package « Rarity », à chaque niveau d'azote et chaque année afin d'évaluer les relations entre les variables et déterminer si elles sont significatives ou non. Les valeurs utilisées sont les valeurs moyennes de chaque génotype issues du BLUP.

Enfin, une analyse de la contribution de chaque composante (NUPE, NUTE) dans la variation de NUE, décrite par Moll et al. (1982), a été effectuée, à chaque niveau d'azote et à chaque année.

Si  $X_{1n}$ ,  $X_{2n}$  représentent le logarithme des deux composantes à n<sup>ième</sup> niveau d'azote, alors  $Y_n$  représente le logarithme du caractère résultant :

$$Y_n = X_{1n} + X_{2n} ;$$

$\sum (X_{1n} Y_n) / \sum Y_n^2$  et  $\sum (X_{2n} Y_n) / \sum Y_n^2$  représentent la contribution nette de chaque composante dans la variation du caractère résultant.

## II.3. Résultats

### II.3.1. Analyse de la variation des caractères étudiés

Le résultat de l'analyse de variance combinée des deux années d'expérimentation (2014-2015 et 2015-2016) pour les 16 caractères agronomiques mesurés sur un panel de riz pluvial est présenté dans le tableau 10. Les effets du génotype et de l'interaction année × niveau d'azote sont significatifs ( $\alpha=5\%$ ) pour tous les caractères. L'effet de l'interaction année × génotype est significatif ( $\alpha=5\%$ ) pour tous les caractères sauf pour la teneur en azote des grains. Compte tenu de ces interactions avec l'année, les résultats seront présentés séparément par année dans les paragraphes qui suivent. L'effet de l'année est significatif ( $\alpha=5\%$ ) pour la date de floraison, le pourcentage de grain pleins, la teneur en azote des grains, le rendement en grains, le nombre de panicules par mètre carré, le nombre d'épillets par panicule, le rendement en pailles et l'azote total dans la plante.

En revanche, le facteur année n'a pas d'effet significatif ( $\alpha=5\%$ ) sur les paramètres de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE, NUPE, NUTE) ainsi que sur l'indice de récolte azoté, l'indice de récolte, la hauteur des plantes, la teneur en azote des pailles et le poids de mille grains. Malgré la grande différence entre les 2 années en termes de pluviométrie totale qui est l'une des composantes du facteur « année » (1612 mm en 2014-2015 contre 1222 mm en 2015-2016) pouvant jouer sur la disponibilité de l'azote pour la culture, les caractères liés à la nutrition azotée (comme NHI, SNC, NUE, NUPE, NUTE) ne sont pas

Tableau 10: Test F, test Z et test t de l'analyse de variance des 16 caractères étudiés sur le panel de riz pluvial.

Le paramètre F a été calculé pour les effets fixes et le paramètre Z pour les effets aléatoires. L'effet de l'azote seul a été calculé par année à l'aide du test t

Caractères	Effet fixe (test F)				Effet aléatoire (test Z)				Test t	
	Année	Répétition (année)	Bloc (année×rép)	Année × azote	Génotype	Année × génotype	Génotype × azote	Année × génotype × azote	Azote 2015	Azote 2016
<b>DTFL</b>	11,87 *	6,76 *	1,68 *	13,95 *	8,26 *	8,06 *	-	-	-2,22 *	3,03 *
<b>FG</b>	12,60 *	16,05 *	0,79 ns	60,28 *	6,81 *	4,32 *	5,00 *	4,60 *	-2,99 *	-0,73 ns
<b>GNC</b>	9,99 *	83,32 *	2,43 *	433,93 *	5,64 *	1,23 ns	4,49 *	1,46 ns	8,84 *	5,85 *
<b>GY</b>	10,26 *	1,36 ns	1,01 ns	80,07 *	5,05 *	2,55 *	3,51 *	1,29 ns	2,99 *	4,90 *
<b>HI</b>	0,14 ns	13,94 *	0,67 ns	74,36 *	7,77 *	5,30 *	3,19 *	1,67 *	-2,59 *	-2,47 *
<b>NHI</b>	1,25 ns	20,51 *	1,16 ns	73,59 *	7,04 *	3,39 *	0,38 ns	3,47 *	-1,85 ns	-3,13 *
<b>NUE</b>	0,01 ns	16,37 *	2,68 *	272,76 *	4,68 *	1,82 *	2,97 *	1,62 ns	-7,37 *	-4,96 *
<b>NUPE</b>	1,28 ns	4,88 *	2,00 *	42,77 *	2,80 *	2,50 *	3,51 *	-	-3,22 *	-1,68 ns
<b>NUTE</b>	1,08 ns	55,58 *	1,30 ns	329,36 *	5,80 *	2,94 *	2,86 *	1,78 *	-8,65 *	-6,58 *
<b>PANM2</b>	6,45 *	25,04 *	1,20 ns	214,01 *	6,83 *	2,15 *	1,72 *	0,84 ns	5,85 *	6,28 *
<b>PH</b>	1,98 ns	21,59 *	2,07 *	306,65 *	9,18 *	4,48 *	3,83 *	-	7,40 *	7,67 *
<b>SNC</b>	1,33 ns	58,39 *	2,05 *	223,69 *	3,54 *	4,17 *	-	2,98 *	6,49 *	6,87 *
<b>SPIPAN</b>	5,05 *	8,56 *	1,60 *	20,73 *	6,66 *	4,29 *	1,30 ns	-	2,57 *	1,21 ns
<b>SY</b>	20,52 *	14,31 *	1,65 *	434,77 *	4,83 *	2,21 *	0,73 ns	0,86 ns	7,51 *	11,00 *
<b>TGW</b>	1,28 ns	0,58 ns	0,69 ns	26,67 *	9,25 *	6,76 *	3,63 *	-	-2,32 *	-0,07 ns
<b>TNUP</b>	19,70 *	42,05 *	1,75 *	457,81 *	2,76 *	2,24 *	2,87 *	0,60 ns	8,88 *	10,86 *
<b>ddl</b>	1	2	52	2	-	-	-	-	54	54

\* : valeur significative à la probabilité p <0,05

ns : non significative à la probabilité p <0,05



significativement différents entre les deux années ( $\alpha=5\%$ ). Il y a un effet répétition par année significatif ( $\alpha=5\%$ ) sur tous les caractères sauf le rendement en grains et le poids de mille grains.

Les valeurs de l'héritabilité des caractères pour chaque niveau d'azote sont présentées dans le tableau 11. Les héritabilités ne changent pas beaucoup pour la plupart des caractères entre les niveaux HN et LN. Les caractères les plus fortement héritables ( $H^2 > 0,8$  en LN comme en HN) sont la date de floraison, le pourcentage de grains pleins, l'indice de récolte, la hauteur de la plante. Lors de l'essai préliminaire, TGW<sup>78</sup>, DTF<sup>79</sup>, FG<sup>80</sup> et HI<sup>81</sup> présentent aussi les plus fortes héritabilités. Les caractères qui présentent les plus faibles héritabilités sont la teneur en azote des pailles ( $H^2 < 0,5$  en 2015), le rendement en pailles ( $H^2=0,44$  en 2015-HN et 0,27 en 2016-LN), l'azote total dans la plante ( $H^2=0,48$  en 2015-HN et 0,34 en 2016-LN) et l'efficacité de l'absorption de l'azote ( $H^2=0,47$  en 2015-HN et 0,35 en 2016-LN). C'était aussi le cas dans l'essai préliminaire sauf pour le rendement en pailles dont l'héritabilité est plus élevée ( $H^2>0,7$ ). L'héritabilité du nombre de panicules par mètre carré est plus faible dans cet essai ( $0,59<H^2<0,67$ ) que dans l'essai préliminaire ( $H^2=0,89$ ).

### II.3.2. Effet du niveau de la fertilisation azotée sur les caractères étudiés

Les valeurs de chaque caractère pour chaque niveau d'azote (LN et HN), correspondant à la moyenne de tous les géotypes évalués, et le pourcentage de variation des caractères entre les deux niveaux d'azote sont présentés dans le tableau 11. Les caractères qui augmentent le plus fortement avec l'apport d'azote sont des caractères liés à l'absorption de l'azote et à la production de biomasse comme dans l'essai préliminaire. L'azote total dans la plante a augmenté de 78% en 2015 et de 84% en 2016. Cette augmentation résulte de la combinaison de l'augmentation du rendement en pailles, de la teneur en azote dans les pailles, du rendement en grains et de la teneur en azote des grains. SY<sup>82</sup> a augmenté de 54% et 58% tandis que SNC<sup>83</sup> a augmenté de 32% et 51% en 2015 et 2016 respectivement. GY<sup>84</sup> a augmenté de 27% et de 35% tandis que GNC<sup>85</sup> a augmenté de 33% et 26% en 2015 et 2016 respectivement.

Le rendement en grains est moyennement affecté par la fertilisation azotée. La composante du rendement qui augmente le plus avec l'apport d'azote est PANM2<sup>86</sup> avec 36% en 2015 et 31% en 2016. SPIPAN<sup>87</sup> a augmenté plus modérément avec 11% en 2015 et 8% en 2016. En FG<sup>88</sup> et TGW<sup>89</sup> ont diminué respectivement de 12% et 4% en 2015 et 5% et 0% en 2016, ce qui a été aussi la tendance lors de l'essai

---

<sup>78</sup> Poids de mille grains

<sup>79</sup> Date de floraison

<sup>80</sup> Pourcentage de grains pleins

<sup>81</sup> Indice de récolte

<sup>82</sup> Rendement en pailles

<sup>83</sup> Teneur en azote des pailles

<sup>84</sup> Rendement en grains

<sup>85</sup> Teneur en azote des grains

<sup>86</sup> Nombre de panicules/m<sup>2</sup>

<sup>87</sup> Nombre d'épillets/panicule

<sup>88</sup> Pourcentage de grains pleins

<sup>89</sup> Poids de mille grains

Tableau 11: Valeur phénotypique par année et par niveau d'azote des 16 caractères agronomiques mesurés sur le panel de 198 variétés de riz pluvial. Pourcentage de variation, corrélation entre niveau d'azote et héritabilité à chaque niveau d'azote pour les 16 caractères étudiés.

Caractères	unité	2015				2016				2015		2016	
		LN	HN	corrélation entre HN et LN	variation entre HN et LN	LN	HN	corrélation entre HN et LN	variation entre HN et LN	H <sup>2</sup> <sub>LN</sub>	H <sup>2</sup> <sub>HN</sub>	H <sup>2</sup> <sub>LN</sub>	H <sup>2</sup> <sub>HN</sub>
TNUP	kg/ha	61,37	109,43	0,32 **	78%	78,00	143,37	0,27**	84%	0,52	0,48	0,34	0,55
SY	kg/ha	3385,05	5207,76	0,29 **	54%	4180,86	6620,08	0,51 **	58%	0,53	0,44	0,27	0,55
PANM2	-	216,49	294,75	0,54 **	36%	253,01	332,32	0,53**	31%	0,67	0,59	0,63	0,61
GNC	%	1,29	1,71	0,43 **	33%	1,43	1,79	0,42 **	26%	0,53	0,65	0,66	0,74
SNC	%	0,53	0,70	0,35 **	32%	0,45	0,68	0,47 **	51%	0,47	0,41	0,6	0,68
GY	kg/ha	3358,49	4252,41	0,49 **	27%	4109,28	5533,15	0,34 **	35%	0,63	0,69	0,47	0,71
PH	cm	93,27	108,90	0,88 **	17%	97,04	112,42	0,87 **	16%	0,84	0,94	0,88	0,95
SPIPAN	-	69,30	76,88	0,68**	11%	64,68	69,61	0,58**	8%	0,53	0,71	0,55	0,68
DTFL	jour	97	96	0,92 **	-1%	89	90	0,93 **	1%	0,84	0,84	0,95	0,94
TGW	g	28,09	27,06	0,93**	-4%	28,55	28,55	0,92**	0%	0,95	0,93	0,94	0,96
NHI	-	0,70	0,66	0,65 **	-6%	0,76	0,68	0,56 **	-10%	0,71	0,83	0,65	0,8
HI	-	0,49	0,44	0,79 **	-9%	0,49	0,45	0,68 **	-8%	0,84	0,88	0,82	0,82
FG	%	82,97	73,06	0,73**	-12%	90,87	86,75	0,54**	-5%	0,82	0,88	0,84	0,93
NUPE	kgN/kgN	0,62	0,50	0,32 **	-19%	0,64	0,60	0,27 **	-7%	0,53	0,47	0,35	0,55
NUTE	kg grain/kgN	55,09	38,89	0,49 **	-29%	54,13	38,51	0,47 **	-29%	0,53	0,73	0,71	0,77
NUE	kg grain/kgN	34,18	19,51	0,52 **	-43%	34,43	23,10	0,38**	-33%	0,62	0,68	0,45	0,71

\*\* : coefficient de corrélation de Pearson significatif au seuil de 1%

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

La variation entre HN et LN est calculée comme le pourcentage de variation par rapport à LN

préliminaire (en HN, FG était réduit en moyenne de 5% et TGW de 2%). HI<sup>90</sup> a aussi été modérément réduit avec l'apport d'azote de 9% en 2015 et de 8% en 2016 (Tableau 11).

NUE et ses composantes ont fortement diminué avec l'apport d'azote. NUE est réduit de 43% et de 33%, le NUTE<sup>91</sup> de 29% et 29%, le NUPE<sup>92</sup> de 19% et 7% en 2015 et 2016 respectivement. Dans l'essai préliminaire, les mêmes ordres de grandeur de réduction ont été observés pour le NUE mais par contre, la réduction a été plus forte pour le NUPE que pour le NUTE. La date de floraison est un caractère qui ne varie presque pas quel que soit le niveau d'azote (1% en 2015 et 2016) avec une différence d'un jour entre HN et LN (tableau 11). Les distributions des valeurs phénotypiques des 16 caractères étudiés pour les 198 variétés du panel de génétique d'association pour chaque niveau d'azote et chaque année étudiée sont présentées en (Annexe 4).

### II.3.3. Interaction génotype × niveau de fertilisation azotée

L'analyse de la variance (tableau 10) a montré généralement une interaction génotype × azote significative ( $\alpha=5\%$ ) sauf pour l'indice de récolte azoté, le nombre d'épillets par panicule et le rendement en pailles. Dans l'essai préliminaire par contre, l'effet de l'interaction génotype × azote est beaucoup plus faible. Il existe une interaction génotype × azote significative ( $\alpha=5\%$ ) pour le rendement en grains et ses composantes (PANM2, FG, TGW). La corrélation entre LN et HN pour le rendement en grains n'est pas très élevée,  $r=0,49$  en 2015 et  $r=0,34$  en 2016, mais ces corrélations sont hautement significatives ( $\alpha=1\%$ ) (Tableau 11, Figure 18) Dans l'essai préliminaire, la corrélation entre LN et HN pour GY est plus forte sur les 2 années sur 3 ( $r=0,85$  en 2013 et  $r=0,66$  en 2014). Les rendements en grains ont été plus élevés en 2016 qu'en 2015 avec respectivement 3993 et 3193 kg/ha en LN et 5348 et 4051 kg/ha en HN.

Pour les composantes de rendement, la corrélation entre LN et HN est très élevée pour le poids de mille grains (TGW),  $r=0,93$  en 2015 et  $r=0,92$  en 2016 (Tableau 11), ce qui a aussi été le cas lors de l'essai préliminaire. Pour le pourcentage de grain plein (FG), cette corrélation est un peu élevée en 2015 (0,73) et moyenne en 2016 (0,54) et élevée ( $r=0,73$ ) lors de l'essai préliminaire. Pour le nombre de panicule par mètre carré et le nombre d'épillets par panicule, la corrélation entre LN et HN est moyenne, avec respectivement,  $r=0,54$  et  $r=0,68$  en 2015,  $r=0,53$  et  $r=0,58$  en 2016. Lors de l'essai préliminaire, la corrélation entre LN et HN pour PANM2 et SPIPAN a été très élevée (avec respectivement  $r=0,79$  et  $r=0,80$ , à  $p<0,01$ ).

---

<sup>90</sup> Indice de récolte

<sup>91</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

<sup>92</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

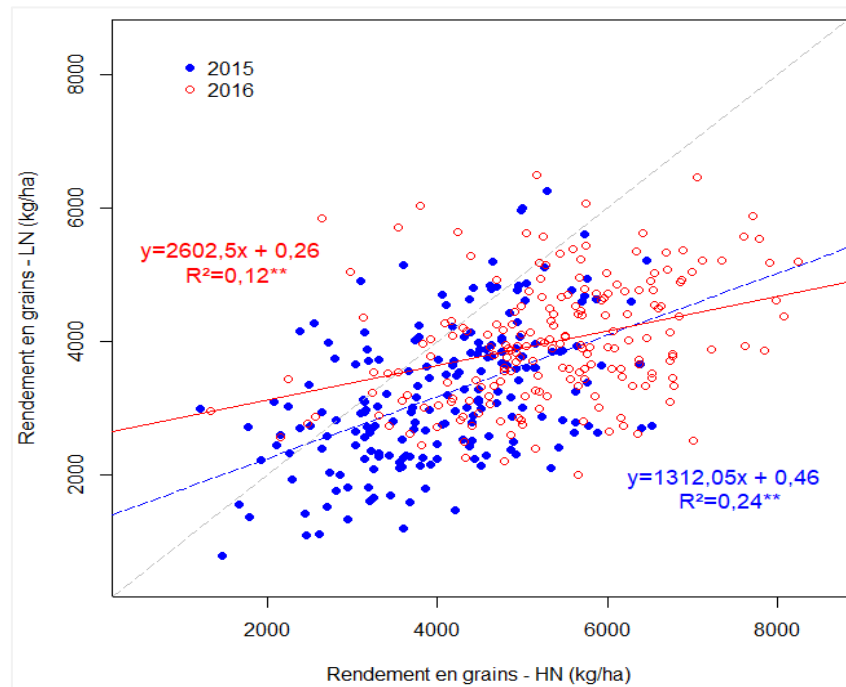


Figure 18: Relations entre le rendement en grains à fort (HN) et à faible (LN) niveau d'azote, par année, sur le panel de 198 variétés de riz pluvial

Pour le nombre de panicules par mètre carré, il existe un effet azote significatif en 2015 et en 2016 et une interaction génotype  $\times$  azote significative ( $\alpha=5\%$ ) (Tableau 10). De plus, les corrélations entre LN et HN sont significatives mais moyennes,  $r=0,54$  en 2015 et  $r=0,53$  en 2016 (Tableau 11, Figure 19). La variété Yangkum red présente un nombre de panicules par mètre carré élevé particulièrement en condition LN. En LN, elle produit 416 panicules par mètre carré en 2015 (le plus élevé) et 433 panicules par mètre carré en 2016 (3<sup>ème</sup> rang). En HN, elle produit 310 panicules par mètre carré (71<sup>ème</sup> rang) en 2015 et 485 panicules par mètre carré (4<sup>ème</sup> rang) en 2016 (Figure 19).

Pour le nombre d'épillets par panicule, l'analyse de variance a montré qu'il n'existe pas d'interaction génotype  $\times$  azote significative ( $\alpha=5\%$ ) (Tableau 10). Il y a un effet azote significatif en 2015 mais pas en 2016 (Tableau 10). Deux variétés ont un comportement remarquable pour SPIPAN<sup>93</sup> à la fois en 2015 et en 2016 (Yunlu 50 et Sebota 402) (Figure 19). En 2015, Yunlu 50 produit 165 épillets par panicule (le plus élevé) en HN et 115 épillets par panicule (le 3<sup>ème</sup> rang plus élevé) en LN. En 2016, Yunlu 50 produit 112 épillets par panicule (le plus élevé) en HN et 102 épillets par panicule (3<sup>ème</sup> rang) en LN. La variété Sebota 402 est intéressante car elle produit plus de grains à faible niveau d'azote qu'à fort niveau d'azote. En LN, elle donne 172 épillets par panicules en 2015 (le plus élevé) et 104 épillets par panicule en 2016 (2<sup>ème</sup> rang) (Figure 19). Mais en HN, elle produit moins, avec 113 épillets par panicule en 2015 (5<sup>ème</sup> rang plus élevé)

<sup>93</sup> Nombre d'épillets/panicule

et 89 épillets par panicules en 2016 (16<sup>ème</sup> rang). Lors de l'essai préliminaire, Sebota 402 a produit le nombre d'épillets par panicule le plus élevé quel que soit le niveau d'azote.

Pour le pourcentage de grains pleins (FG), l'effet de l'azote a été significatif ( $\alpha=5\%$ ) en 2015 et non significatif en 2016 et l'interaction génotype  $\times$  azote est significative ( $\alpha=5\%$ ) (Tableau 10, Figure 20). La variété Yunlu 50 qui présente un nombre d'épillets par panicule très élevé tant en HN qu'en LN possède un niveau de fertilité très faible surtout en HN (en 2015 : 34,8% en HN et 69,5% en LN; en 2016 : 63,8% en HN et 85,5% en LN) (Figure 20). La variété Yangkum red qui présente un nombre de panicules par mètre carré particulièrement élevé en 2015 et en 2016, possède un faible pourcentage de grains pleins sauf en 2016 LN (en 2015 : 31,7% en HN et 60,1% en LN; en 2016 : 41,9% en HN et 93,9%) (Figure 20). La variété Yunlu 64 est toujours faible en pourcentage de grains pleins quel que soit le niveau d'azote et l'année (FG de 40,9% en HN et 43,3% en LN en 2015 et en 2016, FG de 36,7% en HN et 59,3% en LN) (Figure 20).

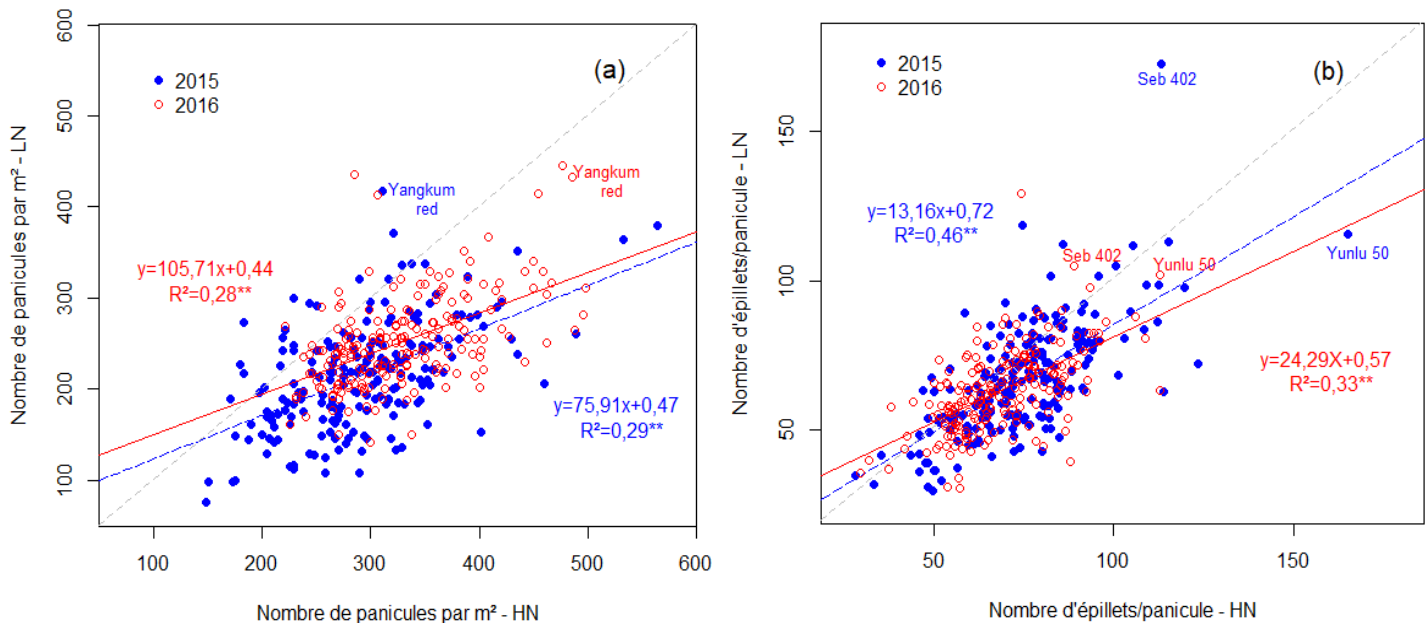


Figure 19: Relation entre le nombre de panicules par mètre carré à fort (HN) et à faible (LN) niveau d'azote (a) et relation entre le nombre d'épillets par panicule à fort niveau (HN) et à faible niveau (LN) d'azote (b)

Pour le poids de mille grains, l'analyse de la variance montre un effet de l'azote significatif ( $\alpha=5\%$ ) en 2015 mais non significatif en 2016 (Tableau 10). Il existe aussi une interaction génotype  $\times$  azote significative ( $\alpha=5\%$ ) pour le poids de mille grains. Deux variétés Exp 013 et Sebota 404 présentent les meilleurs remplissages de grains. La variété Exp 013 a le poids de mille grains le plus élevé quel que soit l'année et le niveau d'azote (en 2015 : 40 g en HN et 43,3 g en LN; en 2016 : 43,7 g en HN et 40,3 g en LN) (Figure 20), mais elle présente un nombre d'épillets par panicule faible (50 en 2015-HN et 36 en 2015-LN; 31 en 2016-HN et 39 en 2016-LN). La variété Sebota 404 est en 2<sup>ème</sup> rang parmi toutes les variétés évaluées pour le poids de mille grains (En 2015, 37,1 g en HN et 41,2 g en LN; en 2016 : 39,5 g en HN et

38,3 g en LN (Figure 20). La variété Yunlu 50 possède le nombre le plus élevé d'épillets par panicule mais un poids de grains faible surtout en 2015 (TGW<sup>94</sup> en 2015 : 18,6 g en HN et 16,9 g en LN (Figure 20); TGW en 2016 : 20,3g en HN et 21 g en LN). La variété Yangkum red se présente comme la plus faible en poids de grains (en 2015 : 15,9 g en HN et 18,2 g en LN; en 2016, 18,9 g en HN et 21,2 g en LN) (Figure 20).

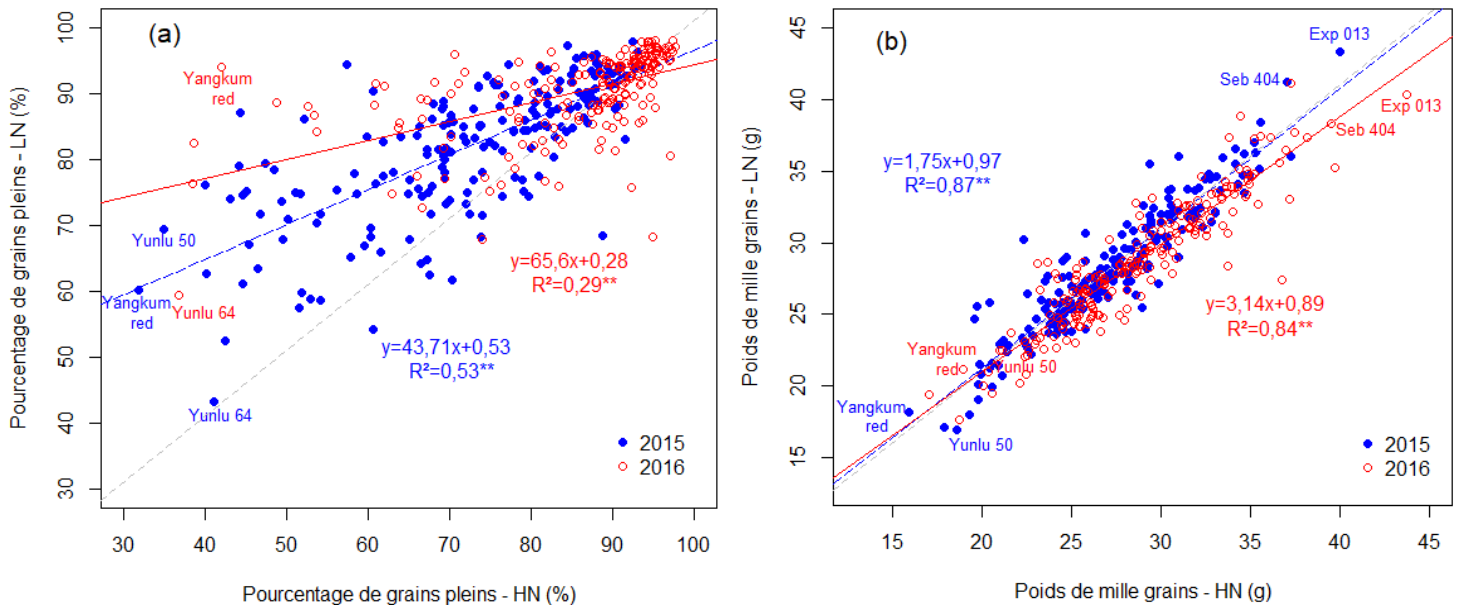


Figure 20: Relation entre le pourcentage de grains pleins à fort (HN) et à faible (LN) niveau azote (a) et relation entre le poids de mille grains à fort (HN) et à faible (LN) niveau d'azote (b)

### II.3.4. Contribution de leurs composantes à l'efficacité de l'utilisation de l'azote et au rendement en grains

#### II.3.4.1. Contribution de NUPE et NUTE à la variation du NUE

La variabilité du NUE des 198 variétés du panel est plus importante en condition LN qu'en condition HN. En LN, NUE varie de 8,4 à 57,1 kg grains/kgN en 2015 et de 14 à 54,8 kg grains/kgN en 2016, tandis qu'en HN, il varie 5,5 à 31,0 kg grains/kgN en 2015 et de 5,26 à 33,95 kg grains/kgN en 2016 (Annexe 4). La variabilité phénotypique des composantes du NUE, NUPE<sup>95</sup> et NUTE<sup>96</sup>, est aussi plus importante en LN qu'en HN. Pour NUPE, en 2015, il varie de 0,25 à 0,75 kgN/kgN en HN et de 0,28 à 1 kgN/kgN en LN et en 2016, il varie de 0,27 à 0,86 kgN/kgN en HN et de 0,23 à 0,94 kgN/kgN en LN (Annexe 4). Quant à NUTE, il varie en 2015, de 19,55 à 51,59 kg grains/kgN en HN et de 28,37 à 75,27 kg grains/kgN en LN et en 2016, de 18,71 à 49,16 kg grains/kgN en HN et de 33,56 à 74,92 kg grains/kgN en LN (Annexe 4).

<sup>94</sup> Poids de mille grains

<sup>95</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>96</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

La variation de NUPE <sup>97</sup> contribue plus que celle de NUTE <sup>98</sup> à la variation du NUE quel que soit l'année ou le niveau d'azote (Tableau 12). Ceci est similaire aux résultats trouvés lors des essais préliminaires. Lors de ce dernier, la contribution relative supérieure du NUPE par rapport au NUTE était encore plus marquée en conditions LN deux années sur trois. Dans le panel, cette même tendance a été observée uniquement en 2015.

Tableau 12: Contribution de ses composantes (NUPE et NUTE) à la variation de NUE

Résultante	Composantes	2015		2016	
		LN	HN	LN	HN
log (NUE)	log (NUPE)	0,80	0,68	0,67	0,69
	log (NUTE)	0,19	0,31	0,30	0,30

Log : logarithme népérien  
 LN : faible niveau d'azote  
 HN : fort niveau d'azote

Concernant les corrélations entre le NUE et ses composantes NUPE et NUTE, les mêmes tendances ont été observées. Le NUE est corrélé positivement et significativement ( $\alpha=1\%$ ) au NUPE et au NUTE, quel que soit le niveau d'azote ou l'année mais la corrélation est plus forte dans tous les cas de figure entre NUE et NUPE qu'entre NUE et NUTE. En 2015, la corrélation entre NUE et NUPE est de  $r=0,90$  en LN et  $r=0,84$  en HN), alors que la corrélation entre NUE et NUTE est de  $r=0,52$  en LN, et  $r=0,70$  en HN (Figure 21). De la même manière en 2016, la corrélation entre NUE et NUPE est plus forte ( $r=0,81$  en LN et  $r=0,83$  en HN) qu'entre NUE et NUTE ( $r=0,35$  en LN et  $r=0,73$  en HN) (Figure 21). Entre les composantes (NUPE et NUTE), il existe une faible corrélation. En 2015, elle est positive et significative ( $\alpha=1\%$ ) seulement en HN. En 2016, la corrélation entre ces deux caractères reste faible mais significative à deux niveaux d'azote. Toutefois, elle est négative en LN ( $r= -0,22$ ) alors qu'elle est positive en HN ( $r=0,25$ ). En revanche, dans l'essai préliminaire, la corrélation entre NUPE et NUTE n'est pas significative ( $\alpha=1\%$ ).

Il existe une corrélation positive significative ( $\alpha=1\%$ ) très forte entre le rendement en grains (GY) et le NUE (Figure 21). En condition HN, cette corrélation ( $r=0,97$  en 2015 comme en 2016) est un peu plus forte qu'en condition LN ( $r=0,91$  en 2015 et  $r=0,87$  en 2016). Dans la présente expérimentation, le rendement en grains (GY) est un proxy du NUE.

<sup>97</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote  
<sup>98</sup> Efficacité de la conversion de l'azote

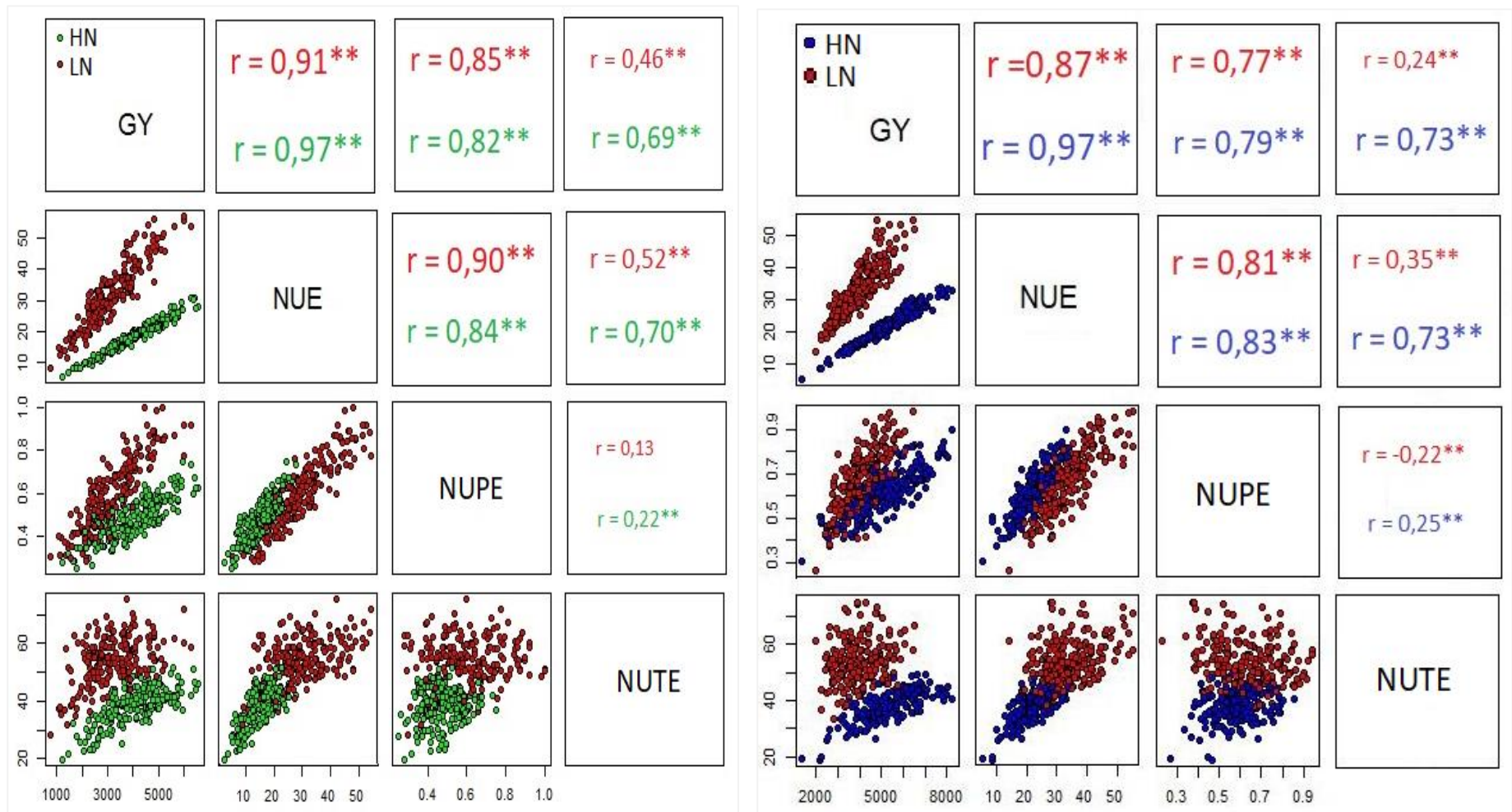


Figure 21: Corrélation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE), le rendement en grains (GY), l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) et l'efficacité de la conversion de l'azote (NUTE) du riz pluvial, par niveau d'azote en 2015 (à gauche) et en 2016 (à droite)

\*\* : significatif au seuil de 1%

HN : fort niveau d'azote

LN : faible niveau d'azote



## II.3.4.2. Contribution de ses composantes à la variation du rendement en grains

Le rendement en grains a été décomposé en 4 composantes qui sont le nombre de panicules par mètre carré, le nombre d'épillets par panicule, le pourcentage de grains pleins et le poids de mille grains. Le tableau 13 montre la contribution de ces 4 composantes à la variation du rendement en grains. La contribution respective des différentes composantes varie entre les deux niveaux de nutrition azotée. A faible niveau d'azote, ce sont les contributions de SPIPAN<sup>99</sup> (36% en 2015 et 39% en 2016) et de TGW<sup>100</sup> (25% en 2015 et 39% en 2016) qui sont les plus importantes. A fort niveau d'azote, la contribution de TGW reste toujours importante (31% en 2015 et 40% en 2016) mais la contribution de FG<sup>101</sup> devient prépondérante (43% en 2015 et 40% en 2016). PANM2<sup>102</sup> contribue très faiblement à la variation du rendement en grains en conditions de fort niveau d'azote (9% en 2015 et 5% en 2016).

Tableau 13: Contribution du nombre de panicules par mètre carré (PANM2), du nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), du pourcentage de grains pleins (FG) et du poids de mille grains (TGW) à la variation du rendement en grains (GY), par année et par niveau d'azote

Résultante	Composantes	2015		2016	
		LN	HN	LN	HN
log (GY)	log (PANM2)	0,25	0,09	0,11	0,05
	log (SPIPAN)	0,36	0,16	0,39	0,15
	log (FG)	0,13	0,43	0,10	0,40
	log (TGW)	0,25	0,31	0,39	0,40

Log : logarithme népérien

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

Il existe une corrélation positive significative ( $\alpha=5\%$ ) entre GY et ses 4 composantes sauf en 2015 LN pour TGW (Figure 22). Les trois composantes PANM2, SPIPAN et FG expliquent la variation du rendement dans des proportions relativement similaires. Toutefois, la corrélation entre FG et GY est la plus forte en conditions HN que ce soit en 2015 ( $r=0,42$ ) ou en 2016 ( $r=0,54$ ). C'est la corrélation entre GY et TGW qui paraît la plus faible quel que soit le niveau d'azote et quelle que soit l'année. En revanche, les différentes composantes du rendement sont toutes corrélées négativement entre elles sauf TGW et FG qui sont corrélées positivement. L'optimisation du rendement dépend donc d'un compromis difficile à trouver entre toutes ses composantes.

<sup>99</sup> Nombre d'épillets par panicule

<sup>100</sup> Poids de mille grains

<sup>101</sup> Pourcentage de grains pleins

<sup>102</sup> Nombre de panicules par mètre carré

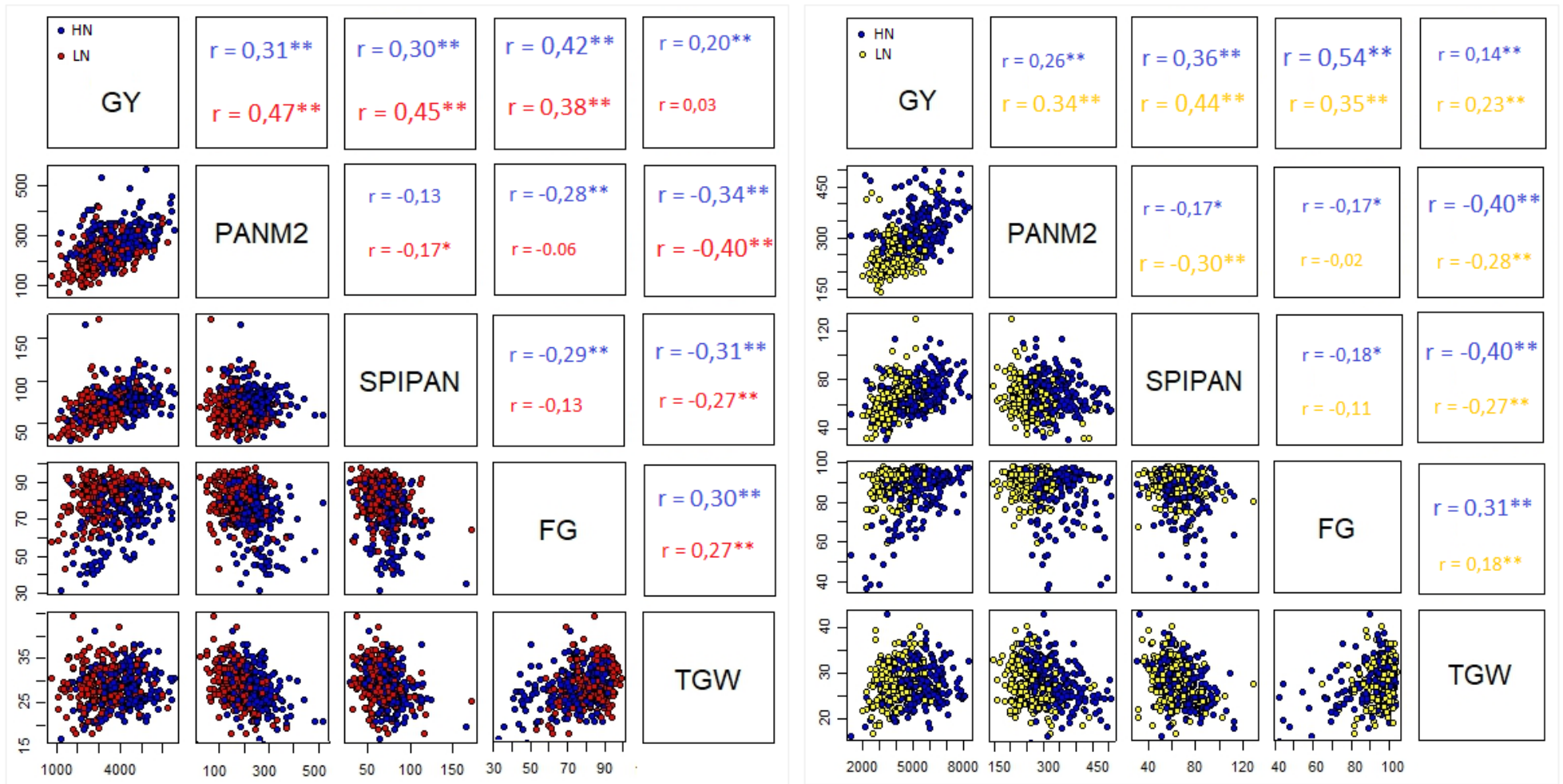


Figure 22: Corrélation entre le rendement en grains (GY) et ses composantes (nombre de panicules par mètre carré (PANM2), nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), pourcentage de grains pleins (FG) et poids de mille grains (TGW)) du riz pluvial, par niveau d'azote et par année, en 2015 (à gauche) et en 2016 (à droite)

\*\* : significatif au seuil de 1%

HN : fort niveau d'azote

LN : faible niveau d'azote

Le point de vue obtenu sur la contribution des différentes composantes du rendement à la variation du rendement, à partir d'un panel de diversité large de 198 variétés, est différent de celui obtenu lors de l'analyse de l'essai préliminaire sur 13 variétés. Dans ce dernier cas, c'est le nombre de panicules par mètre carré qui est prépondérant par rapport aux autres. Dans le panel de 198 variétés, la forte contribution du pourcentage de grains pleins, particulièrement à fort niveau d'azote, est certainement liée à la faible adaptation aux conditions pluviales du Moyen Ouest de Madagascar de certaines variétés qui se traduit par un faible niveau de fertilité de celles-ci. Cette mauvaise adaptation pourrait être expliquée en partie par une durée de cycle un peu trop longue. Ceci est confirmé par une corrélation négative et significative ( $\alpha=5\%$ ) entre la date de floraison et le pourcentage de grains pleins, quel que soit l'année ou le niveau d'azote (en 2015 :  $r=-0,42$  en LN et  $r=-0,29$  en HN; en 2016 :  $r=-0,33$  en LN et  $r=-0,57$  en HN).

### II.3.5. Relation entre NUE et l'ensemble des autres caractères mesurés

Il existe une corrélation négative significative entre la date de floraison et NUE en 2015-LN ( $r=-0,25$ ), 2015-HN ( $r=-0,29$ ) et en 2016-HN ( $r=-0,22$ ) (Tableau 14). En 2016, cette relation est négative mais non significative en LN. Plus les géotypes sont tardifs et moins ils sont efficaces dans leur utilisation de l'azote (Figure 23). Cette corrélation négative entre NUE et la date de floraison a aussi été observée dans l'essai préliminaire en 2014 et 2015 même si elle n'a pas été significative.

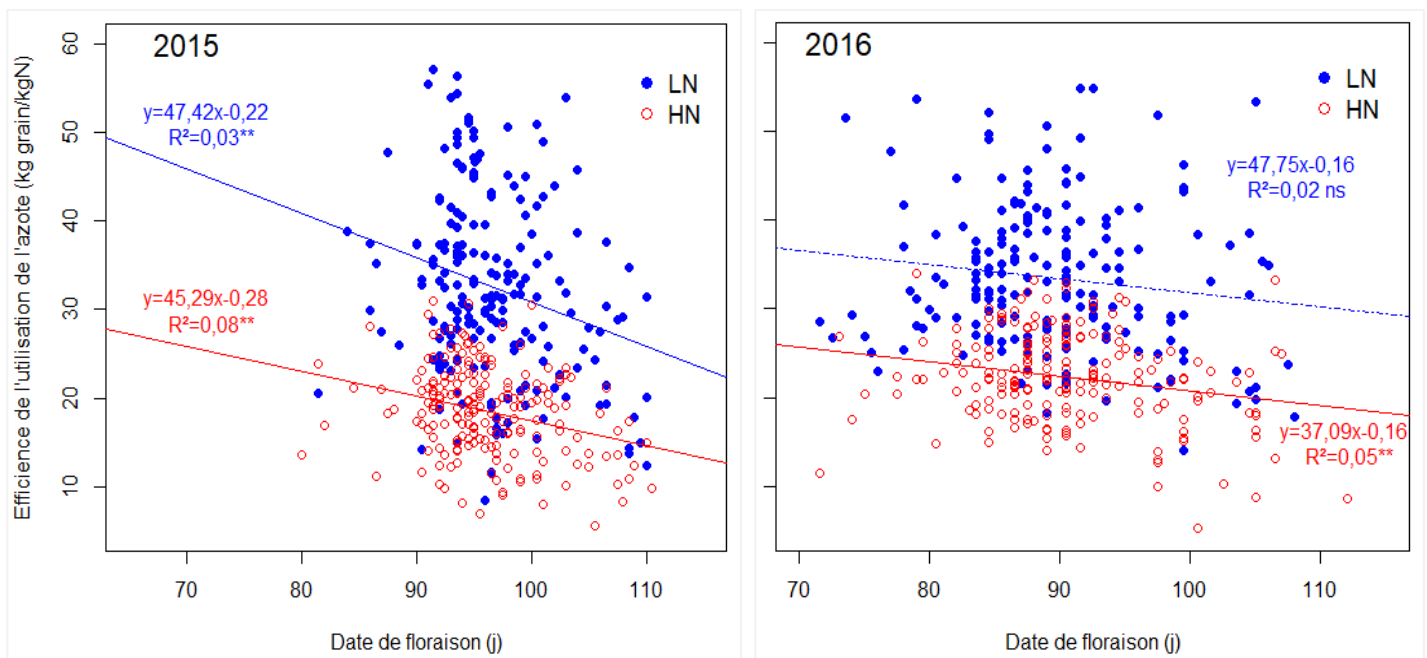


Figure 23: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la date de floraison par niveau d'azote et par année (2015 et 2016) du riz pluvial

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

Tableau 14: Coefficient de corrélation de Pearson entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et les autres caractères (hauteur de la plante, date de floraison, teneur en azote des pailles, teneur en azote des grains, rendement en pailles, poids de mille grains, nombre d'épillets par panicule, nombre de panicules par mètre carré, pourcentage de grains pleins, indice de récolte azoté, azote total absorbé par la plante, indice de récolte) du riz pluvial, par niveau d'azote et par année

Caractères	Signification	2015		2016	
		LN	HN	LN	HN
PH	Hauteur	0,22 *	-0,13 ns	0,13 ns	-0,16 *
DTFL	Date de floraison	-0,25 *	-0,29 *	-0,14 ns	-0,22 *
SNC	Teneur en azote des pailles	-0,27 *	-0,21 *	-0,02 ns	-0,27 *
GNC	Teneur en azote des grains	-0,07 ns	-0,16 *	-0,19 *	-0,32 *
SY	Rendement en pailles	0,52 *	0,11 ns	0,30 *	0,12 ns
TGW	Poids de mille grains	0,04 ns	0,21 *	0,23 *	0,13 ns
SPIPAN	Nombre d'épillets par panicule	0,39 *	0,28 *	0,35 *	0,35 *
PANM2	Nombre de panicules par mètre carré	0,43 *	0,29 *	0,28 *	0,24 *
FG	Pourcentage de grains pleins	0,39 *	0,44 *	0,36 *	0,55 *
NHI	Indice de récolte azoté	0,64 *	0,72 *	0,40 *	0,69 *
TNUP	Azote total absorbé par la plante	0,78 *	0,79 *	0,62 *	0,78 *
HI	Indice de récolte	0,64 *	0,81 *	0,61 *	0,77 *

\*, ns : représentent respectivement une corrélation significative et non significative au seuil de 5%

LN : faible niveau d'azote

HN : fort niveau d'azote

Il existe une corrélation négative entre NUE et teneur en azote des grains (GNC), cette corrélation est significative ( $\alpha=5\%$ ) en 2015-HN ( $r=-0,16$ ), en 2016-LN ( $r=-0,19$ ) et en 2016-HN ( $r=-0,32$ ) (Tableau 14), mais elle est presque inexistante en 2015\_LN ( $r=-0,07$ ) (Figure 24). Lors de l'essai préliminaire, cette relation négative n'avait été trouvée que pour une année sur trois (en 2013). NUE est aussi corrélée négativement avec la teneur en azote des pailles (SNC) (Figure 25). Lors de l'essai préliminaire, NUE était aussi corrélée négativement (de façon non significative) avec SNC sauf en 2015 en condition avec azote. Il existe une corrélation positive et significative ( $\alpha=5\%$ ) entre NUE et le rendement en pailles (SY) (Figure 26) en LN seulement ( $r=0,52$  en 2015 et  $r=0,30$  en 2016) (Tableau 14).

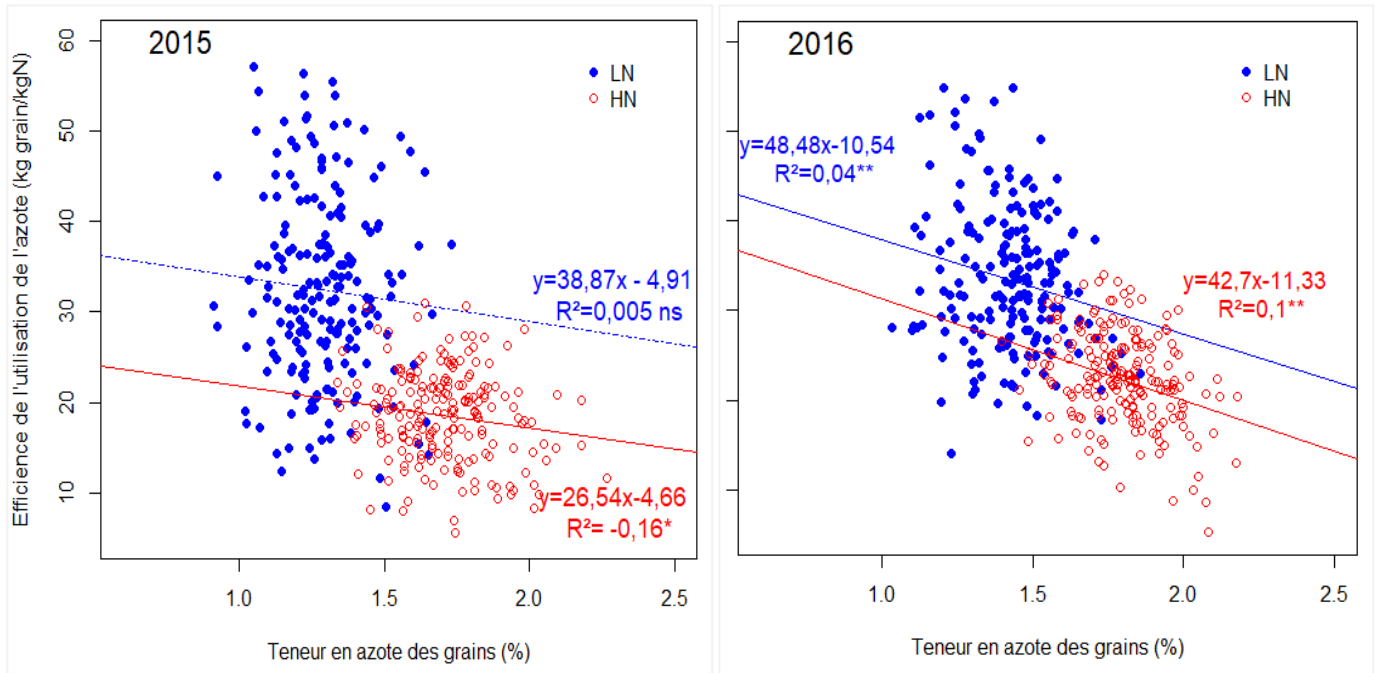


Figure 24: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la teneur en azote des grains du riz pluvial, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016)

LN : faible niveau d'azote  
 HN : fort niveau d'azote

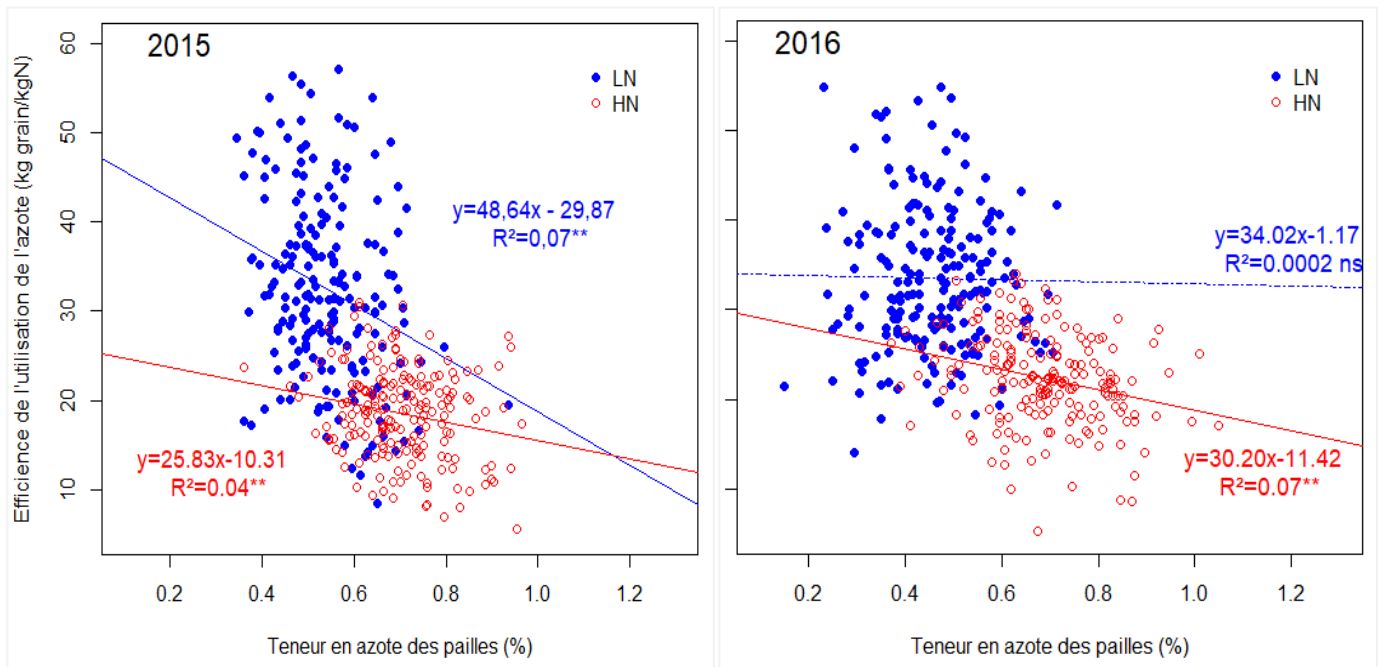


Figure 25: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et la teneur en azote des pailles du riz pluvial, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016)

LN : faible niveau d'azote  
 HN : fort niveau d'azote

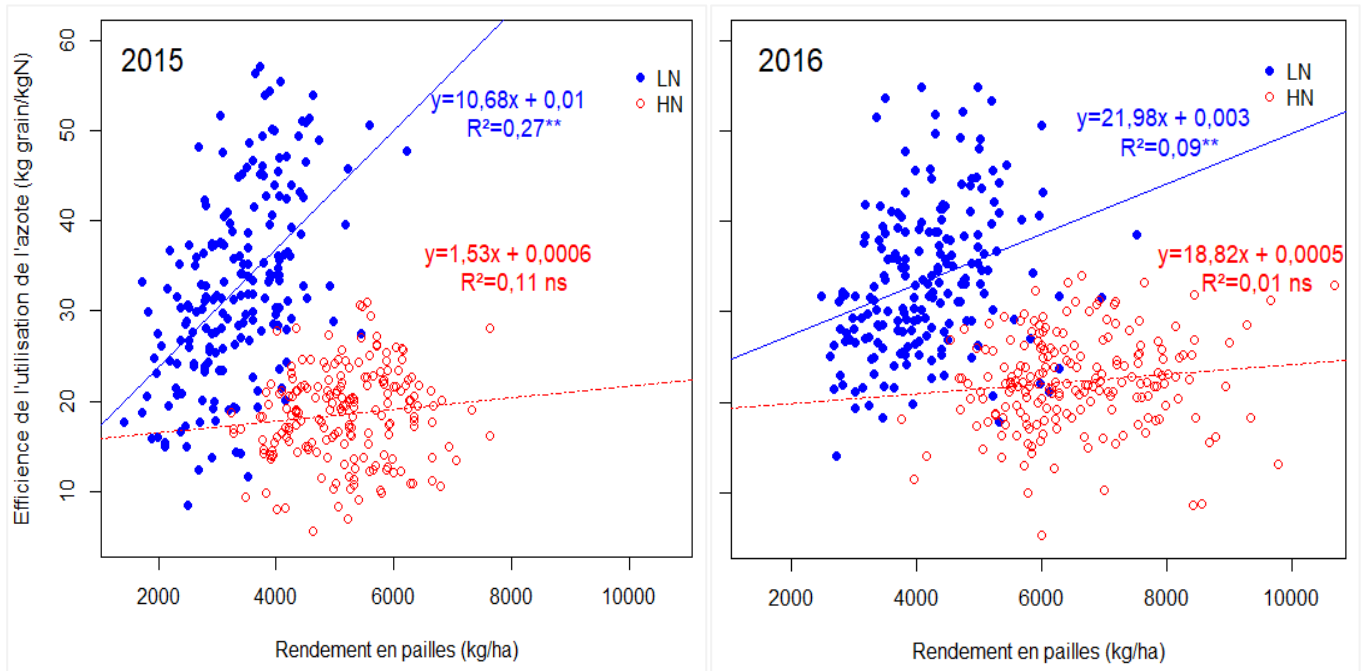


Figure 26: Relation entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote et le rendement en pailles, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016), du riz pluvial

LN : faible niveau d'azote ; HN : fort niveau d'azote

La teneur en azote des grains varie de 1,34 à 2,27 % à fort niveau d'azote et de 0,91 à 1,86 % à faible niveau d'azote (Annexe 4). Ces valeurs sont plus élevées que celles observées lors de l'essai préliminaire. La figure 27 montre la relation entre le rendement en grains et la teneur en azote des grains. A faible niveau d'azote, cette relation est presque inexistante alors qu'à fort niveau d'azote, il existe une corrélation négative et significative ( $\alpha=5\%$ ) ( $r=-0,14$  en 2015 et  $r=-0,34$  en 2016).

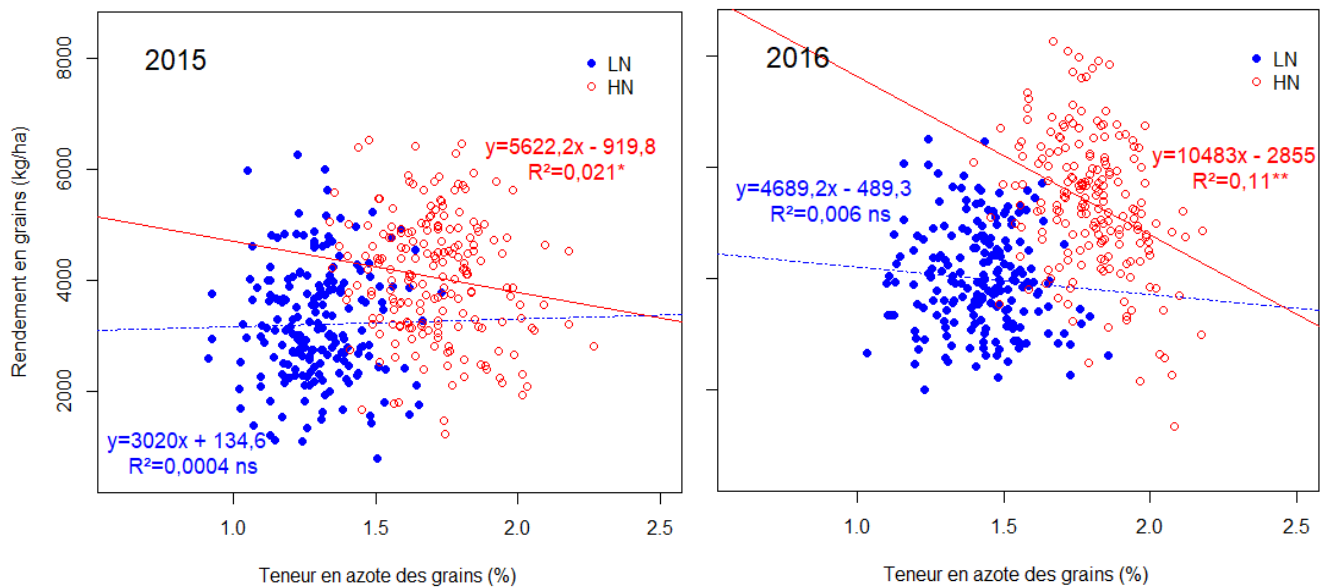


Figure 27: Relation entre le rendement en grains et la teneur en azote des grains, par niveau d'azote et par année (2015 et 2016), du riz pluvial

LN : faible niveau d'azote ; HN : fort niveau d'azote

## II.4. Discussions

L'analyse de variance a montré une variabilité génétique significative pour le NUE et ses composantes NUPE et NUTE, celle-ci a été déjà observée dans l'essai préliminaire, ce que nombreux auteurs ont aussi mis en évidence (Inthapanya et *al.*, 2000; Koutroubas et Ntanos, 2003; Haefele et *al.*, 2008; Wu et *al.*, 2016). Cette variation pour NUE et pour ses composantes permet d'envisager son amélioration génétique chez le riz pluvial. Une variabilité génétique significative a aussi été mise en évidence pour l'ensemble des autres caractères mesurés en lien avec NUE.

Les résultats obtenus ont montré une interaction année  $\times$  azote significative ( $\alpha=5\%$ ), ce qui implique une grande différence de quantité d'azote disponible pour la plante entre les deux campagnes. Cette différence a dû être causée par les différents paramètres climatiques englobés dans le facteur « année » dont la pluviométrie, qui a dû avoir un grand impact sur la disponibilité de l'azote. En effet, la pluviométrie a été excessive en 2014-2015 avec un surplus d'environ 400 mm par rapport à celle de 2015-2016. Cet excès de pluie a probablement entraîné un lessivage de l'azote du sol. La quantité d'azote total absorbé par la plante (TNUP) en 2014-2015 a ainsi été réduit de 27% en condition faible azote (LN) et de 31% en condition fort niveau d'azote (HN) par rapport à TNUP en 2015-2016. La différence de pluviométrie entre les deux campagnes est très marquée au moment du début tallage (vers mi-janvier), ce qui implique une quantité réduite d'azote disponible pour la plante au moment d'émettre les talles réduisant ainsi la biomasse de la plante. Cela se traduit par des valeurs plus faibles pour PANM2 et SY en 2015 par rapport à 2016. Une interaction génotype  $\times$  azote significative aussi a été observée généralement pour la plupart des caractères mesurés. Senapathy et *al.* (2008) ont aussi rapporté cette interaction significative, à l'inverse de Wei et *al.* (2011). Cette interaction avec l'azote complique l'évaluation du NUE et son amélioration génétique qui doit être raisonnée en fonction du niveau de nutrition azoté.

La compréhension de la relation entre NUE et ses composantes constitue un facteur important pour la définition et la mise en œuvre de stratégies d'amélioration de NUE. Il a été montré que NUPE contribue beaucoup plus fortement à la variation de NUE que NUTE quel que soit le niveau d'azote. Mais cette contribution forte de NUPE apparaît encore plus marquée en condition très limitante en azote (LN), ce qui indique que NUPE est un caractère important pour augmenter NUE surtout dans des conditions de stress azoté. Wu et *al.* (2016) ont aussi rapporté l'importance de la contribution de NUPE (64%) à faible niveau d'azote mais par contre dans leur expérimentation, c'est NUTE qui devient prépondérant à fort niveau d'azote.

Parmi les composantes de rendement, le nombre de panicules par mètre carré (PANM2) est le plus influencé par la fertilisation azotée. L'apport d'azote a augmenté PANM2 de 36% en 2015 et 31% en 2016. Le nombre de panicules est fonction du nombre de talles qui joue un rôle important dans la détermination

du rendement. Fageria *et al.* (2003) et Lee *et al.* (2010) ont montré que le nombre de talles est influencé par la fertilisation azotée. Le poids de mille grains (TGW) est la composante la moins influencée par la fertilisation azotée. Une différence de poids de 4% entre les traitements azotés (HN et LN) a été observée en 2015 et aucune différence n'a été constatée en 2016, ce qui montre que le poids de grain est un caractère stable et déterminé plus par les génotypes que par la fertilisation azotée.

Le rendement en riz est déterminé par ses composantes (nombre de panicules, nombre d'épillets par panicule, pourcentage de grains pleins et poids de grains) et il est important de comprendre l'influence de la variation de la teneur en nutriments du milieu sur la variation de ces composantes. Le riz élabore différentes stratégies selon le niveau d'azote du milieu afin d'atteindre de potentiel de rendement. Et les résultats de cette étude ont montré que la contribution de chacune des composantes varie en fonction de la nutrition azotée, sauf celle du poids de mille grains qui reste importante quel que soit le niveau d'azote. En revanche, le nombre de panicules par mètre carré a contribué faiblement à la variation du rendement (ce paramètre apparaît cependant plus important en LN<sup>103</sup> qu'il ne l'est en HN<sup>104</sup>), contrairement à ce qui a été mis en évidence dans l'essai préliminaire (Rakotoson *et al.*, 2017). Selon Lee *et al.* (2000), le nombre de panicules a aussi été identifié comme le principal facteur déterminant le rendement. Il y a un inversement des contributions relatives du nombre d'épillets par panicule et le pourcentage de grains pleins quand les conditions azotées du milieu changent. Le nombre d'épillets par panicule est plus important que le pourcentage de grains pleins en conditions LN (36% et 39% contre 13% et 10% en 2015 et 2016 respectivement). Par contre, le pourcentage de grains pleins est plus important que le nombre d'épillets par panicule en conditions HN (43% et 40% contre 26% et 15% en 2015 et 2016 respectivement). Fageria *et al.* (1997) ont trouvé que parmi les composantes, c'est le nombre de panicule ou le nombre d'épillets par unité de surface qui étaient les composantes les plus variables. Certaines variétés produisent beaucoup de panicules (Yangkum red) ou d'épillets (Yunlu 50) mais présentent un pourcentage de grains pleins et un poids de grains très faibles. Il existe une relation négative entre les composantes du rendement qui sont élaborées à des stades différents du cycle de la plante. Le nombre de panicules par mètre carré et le nombre d'épillets par panicule sont élaborés avant la floraison tandis que le pourcentage de grains pleins est déterminé autour de la floraison et le poids de grains, après la floraison. C'est ce qui a été bien montré dans cette étude où toutes les combinaisons de traitements deux à deux des composantes du rendement sont négativement corrélées entre elles sauf entre le poids de mille grains avec le pourcentage de grains pleins (Figure 22).

---

<sup>103</sup> Faible niveau d'azote

<sup>104</sup> Fort niveau d'azote



Une relation négative est observée entre NUE et la date de floraison. Les variétés les plus tardives sont en effet moins efficaces pour leur utilisation de l'azote. A l'inverse, Koutroubas et Ntanos (2003) ont trouvé que les variétés tardives sont beaucoup plus efficaces. Ces résultats impliquent que NUE diffère selon la durée du cycle de la plante.

La teneur en azote des grains varie de 0,91 % à 2,18 %, ce qui représente une variation plus large que celle observée lors de l'essai préliminaire (1,14 % à 1,70 %). NUE est corrélée négativement avec la teneur en azote des grains. Une corrélation négative entre NUE et la teneur en azote des pailles a aussi été montrée. Koutroubas et Ntanos (2003) ont aussi trouvé que la faible teneur en azote présente dans les pailles et les grains étaient liés à une forte efficacité de l'utilisation de l'azote. Inthapanya et *al.* (2000) ont trouvé une corrélation négative entre NUE et GNC mais n'ont pas trouvé de corrélation entre NUE et SNC.

## II.5. Conclusion partielle de la partie II

Cette partie a pour objectif d'évaluer la variabilité phénotypique, à deux niveaux de fertilisation azotée, du NUE, de ses deux composantes et d'autres caractères agronomiques tels que le rendement en grains et ses composantes, la date de floraison, la quantité d'azote dans les grains et les pailles et la quantité totale d'azote absorbé par la plante. Les résultats ont montré qu'il existe une variabilité génotypique pour NUE et tous les autres caractères agronomiques mesurés sur un panel de 198 variétés de riz pluvial. Il existe aussi une interaction génotype  $\times$  azote significative pour NUE et pour la plupart des caractères. L'analyse de la relation entre NUE et ses composantes a montré que NUPE contribue plus à la variation de NUE que NUTE, quel que soit le niveau d'azote et l'année. Une corrélation positive significative entre le rendement en grains et ses composantes a été observée. Ces composantes contribuent de manière différente à l'élaboration du rendement selon le niveau d'azote du milieu, sauf le poids de mille grains, qui reste toujours important. A faible niveau d'azote, le nombre d'épillets par panicule contribue plus, alors qu'à fort niveau d'azote, la contribution du pourcentage de grains pleins devient importante.

## III. Étude d'association pangénomique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et des caractères qui lui sont liés sur le riz pluvial

### [Genome wide association study of nitrogen use efficiency and related agronomic traits in upland rice](#)

Tatiana RAKOTOSON<sup>1,3</sup>, Julie DUSSERRE<sup>4</sup>, Philippe LETOURMY<sup>4</sup>, Julien FROUIN<sup>5</sup>, Isabelle RATSIMIALA RAMONTA<sup>2</sup>, Noronirina Victorine RAKOTOARISOA<sup>2</sup>, Tuong-Vi CAO<sup>5</sup>, Kirsten VOM BROCKE<sup>1,6</sup>, Alain RAMANANTSOANIRINA<sup>1</sup>, Nourollah AHMADI<sup>5</sup>, Louis-Marie RABOIN<sup>4</sup>

<sup>1</sup> FOFIFA – SRR, Antsirabe, BP 230, Antsirabe 110, Madagascar.

<sup>2</sup> Université d'Antananarivo - Faculté des Sciences, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar.

<sup>3</sup> Université d'Antananarivo - IESAV, BP 108, Antsirabe 110, Madagascar.

<sup>4</sup> CIRAD Montpellier, UPR AIDA, TA B-115, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France.

<sup>5</sup> CIRAD Montpellier, UMR AGAP, TA A-108, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France.

<sup>6</sup> CIRAD Antsirabe, DP SPAD, Antsirabe 110, Madagascar.

Cette partie va porter sur l'étude d'association pangénomique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du riz pluvial et d'autres caractères agronomiques sur un panel de large diversité et fera l'objet d'un article scientifique. L'article est cours de finition et sera prochainement publié dans une revue à comité de lecture. Il est intitulé « Genome wide association study of nitrogen use efficiency and related agronomic traits in upland rice », et est rapporté ici en version française.

### III.1. Introduction

L'augmentation des rendements agricoles est un défi mondial pour contribuer à la sécurité alimentaire pour une population mondiale qui continuera de croître au cours des quatre prochaines décennies (Godfray et al., 2010). Compte tenu de la compétition pour les terres résultant d'autres activités humaines et de la réduction alarmante des écosystèmes naturels et de la biodiversité (Cardinale et al., 2012), il est nécessaire de produire davantage à partir de la même surface, voire à partir de moins de surface. L'amélioration génétique des rendements des cultures reste un objectif majeur et l'importance de l'efficacité de l'utilisation de l'eau et des nutriments, ainsi que la tolérance aux stress abiotiques augmentera dans ce contexte de changement environnemental. La mise au point de nouvelles méthodes de sélection, de génotypage et phénotypage à haut débit devrait permettre d'explorer la diversité génétique disponible dans le matériel génétique de sélection et d'accélérer l'amélioration des plantes (Tester et Langridge, 2010). Ces objectifs sont particulièrement pertinents pour le riz pluvial (*Oryza sativa*) qui est une culture de subsistance en Afrique subsaharienne, cultivée principalement dans des systèmes de cultures à faibles intrants, soumise à de fortes contraintes biotiques et abiotiques. Les études d'association pangénomiques (GWAS) sont récemment apparues comme un outil puissant pour chercher des allèles intéressants dans les populations naturelles des plantes cultivées. L'approche de génotypage à haut débit avec reséquençage du génome à faible couverture permet désormais une couverture entière du génome avec des marqueurs SNP à un coût raisonnable (Huang et Han, 2014). GWAS s'appuie sur le déséquilibre de liaison (DL) pour détecter les associations entre les variations phénotypiques et les variations des séquences d'ADN (marqueurs SNP<sup>105</sup>). La puissance et la résolution de la génétique d'association dépendent de l'étendue du DL. Les plantes autogames comme le riz, dans lesquelles le DL s'étend sur plus de 100 kb, convient donc parfaitement à l'approche GWAS. L'inconvénient est que l'identification des polymorphismes causatifs pour les variations phénotypiques n'est pas simple et nécessite des analyses supplémentaires pour sélectionner les gènes candidats (Han et Huang, 2013). La structure et l'apparentement de la population peuvent entraîner des faux positifs entre les marqueurs et les phénotypes, car un mélange de population crée du DL entre des locus non liés. Des modèles mixtes ont été développés pour prendre en compte ces différents niveaux de parenté (Yu

---

<sup>105</sup> Polymorphisme d'un seul nucléotide

et *al.*, 2006) et ont été implémentés dans le logiciel TASSEL (Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage; Bradbury et *al.*, 2007) et affinés afin de réduire le temps de calcul (Zhang et *al.*, 2010). GWAS a été utilisé avec succès pour disséquer une très grande diversité de caractères qualitatifs et quantitatifs complexes sur le riz détaillé par Zhang et *al.* (2016) qui englobe les composantes de rendements, la date de floraison, la croissance et l'architecture des plantes et des racines, la vigueur de la graine lors de la germination, la morphologie et la qualité des grains, la teneur en métaux lourds des grains, la résistance aux maladies, la tolérance au sel, la résistance à la sécheresse, la tolérance à la chaleur des épillets, le taux des métabolites.

L'azote est un élément clé des protéines et des acides nucléiques et est donc crucial pour la croissance et le développement de la plante. L'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) est une préoccupation dans l'agriculture à fort niveau d'apports d'intrants pour réduire les pertes d'azote et les effets néfastes environnementaux et économiques associés (Raun et Johnson, 1999), ainsi que dans l'agriculture à faible intrant pour augmenter la teneur en protéines et le rendement (Dawson et *al.*, 2008). NUE est un caractère quantitatif complexe impliquant l'absorption, la translocation, l'assimilation et la remobilisation de l'azote, qui interagissent tous avec des facteurs environnementaux. Un grand nombre de gènes impliqués à chaque étape de NUE ont été caractérisés sur le riz (Li et *al.*, 2017). Certains de ces gènes peuvent contribuer à la variabilité génétique de NUE. Par exemple, la variation du gène de transport de nitrate « NRT1.1B » entre *indica* et *japonica* est associée à une augmentation de l'absorption de l'azote et du transport de l'azote de la racine à la partie aérienne. Le transfert de « NRT1.1B » dans différents fonds génétiques *japonica* a confirmé l'intérêt de ce gène pour la sélection (Hu et *al.*, 2015). Cependant, à des fins de sélection, il est nécessaire d'identifier les allèles qui contribuent le plus à la variabilité génétique existante observée pour NUE et ses composantes parmi les ressources génétiques du riz. Peu d'études de cartographie de QTLs ont été réalisées sur du riz pour des caractères liés au NUE.

La première étude de Obara et *al.* (2001) a révélé sept QTLs associés à la teneur en glutamine synthétase 1 (GS1) et six QTLs associés à la teneur en protéines de NADH-GOGAT dans un ensemble de lignées issues de Nipponbare/Kasalath. Certains de ces QTLs étaient localisés avec des caractères physiologiques liés au recyclage de l'azote pendant la sénescence. Shan et *al.* (2005) ont détecté des QTLs pour la concentration d'azote dans les grains, pailles et tiges, ainsi qu'un QTL<sup>106</sup> pour NUE sur le chromosome 6 d'une lignée recombinante issue Zhenshan 97/Minghui 63. Cho et *al.* (2007) ont identifié un QTL à effet majeur pour NUE sur le chromosome 9 à faible niveau d'azote en utilisant une population recombinante de Dasanbyeo/TR22183. En analysant une population double haploïde de IR64 et Azucena à trois niveaux d'azote, Senthilvel et *al.* (2008) ont identifié un QTL associé à NUE et au rendement sur le

---

<sup>106</sup> Locus d'un caractère quantitatif

chromosome 3. En utilisant deux populations recombinantes différentes, Li et al. (2010), ont pu identifier deux intervalles de chromosomes détectés de manière stable dans les deux fonds génétiques, mais la plupart des QTLs ont été détectés dans un seul fond. Wei et al. (2011) ont rapporté un total de 10 QTLs pour NUE dans deux expériences distinctes sur les chromosomes 1, 2, 6, 7 et 11 dans la population recombinante de Zhenshan 97 / Minghui 63. En 2012, Wei et al. ont poursuivi l'étude avec la même population recombinante et ont signalé 11 QTLs pour NUE et 15 QTLs pour la tolérance à la déficience en azote, parmi lesquels 4 QTLs sur les chromosomes 1, 3, 4 et 7 étaient communs pour ces deux caractères. Enfin, Zhou et al. (2017) ont évalué en culture hydroponique 128 CSSLs entre le receveur 9311 et le donneur nipponbare afin d'évaluer l'efficacité de l'absorption et de l'utilisation de l'azote. Ils ont identifié un total de 13 QTLs associés à ces deux caractères. D'après la bibliographie, une seule étude d'association a été réalisée sur le riz pour identifier les caractères liés à NUE (Liu et al., 2016). Cependant, ces caractères (hauteur de la plante, nombre de talles et longueur des grains mesurés dans des conditions faibles et normales d'azote) ne tenaient pas compte la teneur en azote dans les différents compartiments de la plante et ne permettraient donc pas d'aborder le NUE. De plus, les 184 variétés de riz étudiées ont été génotypées à faible densité avec 157 marqueurs SSR. Une étude d'association pangénomique pour NUE et les caractères qui lui sont liés, sur un panel de 190 variétés principalement de type *japonica* tropical utilisant 38390 SNP<sup>107</sup> sera présentée ici. Les variétés ont été évaluées pour 16 caractères agronomiques liés à NUE et aux composantes de rendements dans des conditions pluviales, à deux niveaux contrastés d'azote pendant deux campagnes consécutives.

### III.2. Matériels et méthodes

#### III.2.1. Matériel végétal, dispositif expérimental et mesure phénotypique des caractères

Les matériels végétaux utilisés, le dispositif expérimental, la conduite agronomique, les niveaux d'azote appliqués et la mesure phénotypique des caractères agronomiques sont les mêmes que ceux décrits dans les matériels et méthodes de la partie II de ce présent chapitre (voir II.2). Quelques caractéristiques des grains ont été ajoutées aux caractères mesurés décrits dans le tableau 9, ce sont :

- la longueur de l'aristation (AL, « awn length ») mesurée sur une échelle de 1 (sans aristation) à 9 (très longue aristation) ;
- la longueur des grains (GL, « grain length ») mesurée en mm ;
- la largeur des grains (GW, « grain width ») mesurée en mm ;
- l'épaisseur des grains (GT, « grain thickness ») mesurée en mm ;
- la pilosité des grains (GP, « grain pilosity ») mesurée sur une échelle de 1 (sans poil) à 9 (très poilu).

---

<sup>107</sup> Polymorphisme d'un seul nucléotide

### III.2.2. Génotypage

Quelques graines de chacune des 190 variétés de riz ont été cultivées dans le laboratoire du CIRAD à Montpellier pour en extraire l'ADN<sup>108</sup> et procéder au génotypage. L'ADN est extrait des tissus de feuille d'une seule plante de chaque variété en utilisant la méthode MATAB décrite par Risterucci et *al.* (2000) et ensuite dilué à 100 ng/μl. Chaque échantillon d'ADN est digéré séparément avec l'enzyme de restriction ApeKI. Chaque bibliothèque est séquencée à une extrémité dans un canal de cellule à écoulement unique (c'est-à-dire un séquençage à 96 plexes) (Elshire et *al.*, 2011) en utilisant un Illumina HiSeq™ 2000 (Illumina, Inc.). Les séquences d'ADN sont alignées sur le génome de référence du riz (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) (Kawahara et *al.*, 2013) avec Bowtie2. L'exploitation des marqueurs de type SNP<sup>109</sup> est effectuée à l'aide du pipeline Tassel GBS v5. 2.37 (Glaubitz et *al.*, 2014). Les marqueurs avec un « call rate » inférieur à 80%, un taux d'hétérozygotie supérieur à 20% ou une fréquence de l'allèle mineur (MAF, « Minor Allele Frequency ») inférieure à 2,5% sont rejetés. Les hétérozygotes restants sont convertis en données manquantes et les données manquantes sont imputées à l'aide du logiciel Beagle v4.0 (Browning et Browning, 2007). Après imputation, les marqueurs avec une MAF inférieure à 4,2 % (8 individus sur 190) sont supprimés. La matrice finale contient 190 individus et 38390 marqueurs SNP.

### III.2.3. Structure de la diversité génétique et déséquilibre de liaison

L'analyse de la structure de la population est effectuée à l'aide du logiciel DARwin 6.0.14 ([http3](http://3)). Cette analyse est d'abord effectuée pour les 190 variétés en utilisant les 38390 marqueurs SNP puis une autre analyse, combinant ces 190 variétés avec un panel mondial de 3000 variétés utilisé dans « Rice Genome Project » (Li et *al.*, 2014) est faite. Pour cette deuxième analyse, 27326 marqueurs communs entre ces deux panels sont utilisés. Pour calculer le déséquilibre de liaison, le logiciel Tassel 5.2.31 est utilisé. Le déséquilibre de liaison entre marqueurs par chromosome est estimé par  $r^2$  :

$$r^2 (p_A, p_B, p_{AB}) = \frac{D^2}{p_A(1-p_A) p_B(1-p_B)}$$

où  $p_{AB}$ ,  $p_A$  et  $p_B$  représentent respectivement les fréquences de l'haplotype AB, de allèle A et de allèle B à deux SNP.  $D^2 = (p_{AB} - p_A p_B)^2$  représente la carré des différences entre la fréquence de l'haplotype observé et attendu (Van Liere et Rosenberg, 2008). Le DL<sup>110</sup> local entre SNPs dans les régions génomiques contenant des gènes candidats est analysé à l'aide du package « LD Heatmap » du logiciel R (Shin et *al.*, 2006).

<sup>108</sup> Acide Desoxyribonucléique

<sup>109</sup> Polymorphisme d'un seul nucléotide

<sup>110</sup> Déséquilibre de liaison

### III.2.4. Analyse d'association

Pour effectuer l'analyse d'association, le modèle linéaire mixte (MLM) du logiciel Tassel 5.2.31 est utilisé (Bradbury et al., 2007). Lors de cette analyse, le contrôle de la structure de la population (Q) et de l'apparentement (K) sont pris en compte pour éviter les fausses associations (Yu et al., 2006; Zhang et al., 2010). L'analyse de la structure de la population est effectuée par une analyse en composantes principales des données génotypiques (Price et al., 2006). Les cinq premières composantes principales sont retenues pour construire la matrice Q. La matrice d'apparentement est également calculée avec le logiciel Tassel à l'aide de la méthode « center\_IBS ».

Les analyses d'association sont effectuées pour chaque année et pour les deux années ensemble en utilisant les valeurs moyennes BLUP<sup>111</sup> des génotypes et les valeurs BLUP des génotypes dans les conditions HN et LN afin de prendre en compte l'interaction avec l'année et le niveau d'azote (9 analyses d'association par combinaison marqueur/caractère). La valeur maximale de  $-\text{Log}(P)$  parmi ces 9 analyses est considérée pour le choix des associations significatives marqueur-caractère. Le seuil pour la présentation et la discussion des résultats ultérieurs est fixé à  $-\log_{10}(P) = 4$ . La valeur q estimant le taux de fausse association est également calculée à l'aide du package « q-value » du logiciel R (Storey et Tibshirani, 2003).

## III.3. Résultats et discussions

### III.3.1. Évaluation de NUE et d'autres caractères agronomiques

Les résultats de l'analyse de variance (tableau 10) sur les deux campagnes ont montré un effet significatif ( $\alpha=5\%$ ) du génotype pour tous les caractères. Une interaction année  $\times$  génotype significative ( $\alpha=5\%$ ) est observée pour tous les caractères mesurés à l'exception de la teneur en azote des grains. Une interaction année  $\times$  niveau d'azote significative ( $\alpha=5\%$ ) a également été observée pour tous les caractères mesurés, à l'exception de la pilosité des grains et de la longueur des grains. Compte tenu de ces interactions, l'analyse de variance a également été réalisée séparément par année. L'héritabilité des caractères ne change pas beaucoup entre les deux niveaux d'azote. Le rendement en pailles, la teneur en azote des pailles, l'azote total absorbé par la plante et l'efficacité de l'absorption de l'azote sont les caractères présentant les héritabilités les plus faibles (tableau 11). Les distributions des classes phénotypiques sont présentées dans l'annexe 4.

### III.3.2. Structure de la diversité génétique et étendue du déséquilibre de liaison

La relation génétique entre le panel de 190 variétés et le panel mondial (3000 variétés) est présentée dans la figure 28. La grande majorité des variétés de notre panel appartient à la sous-espèce *japonica*. La plupart d'entre elles appartiennent aux groupes *japonica* tropical et subtropical et une seule variété

---

<sup>111</sup> Best linear unbiased predictor

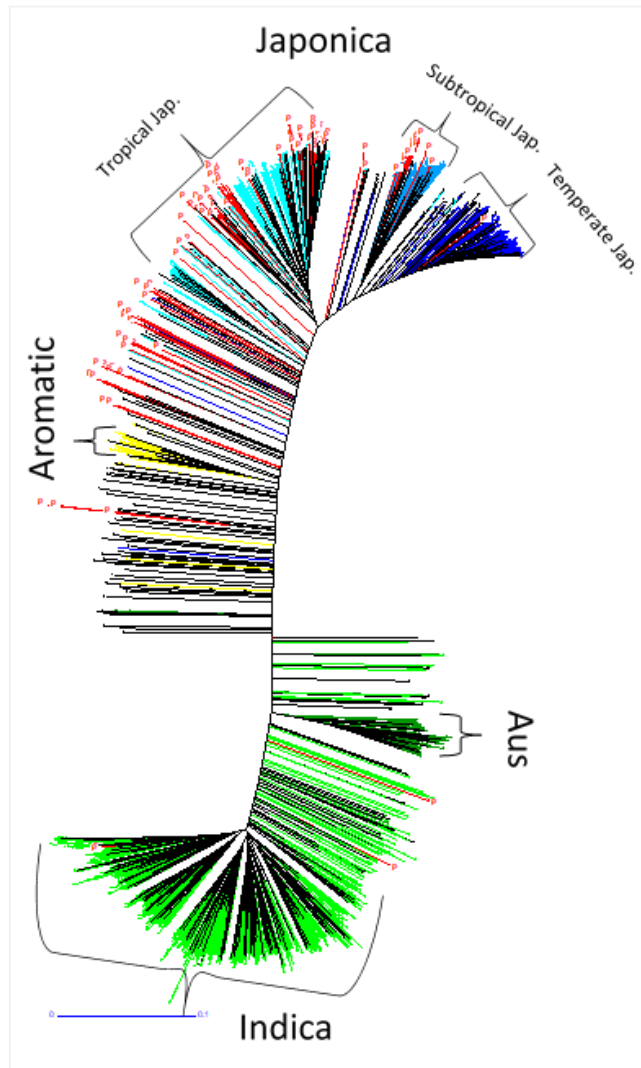


Figure 28: Structure génétique des variétés de riz représentée par l'arbre de type « Neighbour-joining »

L'arbre est basé sur 27326 marqueurs SNP en commun entre les 3024 variétés du projet 3000 génomes de riz (Li et *al.*, 2014) et les 190 variétés utilisées dans cette étude.

Les 190 variétés du panel sont notées par la lettre « P » et colorées en rouge.

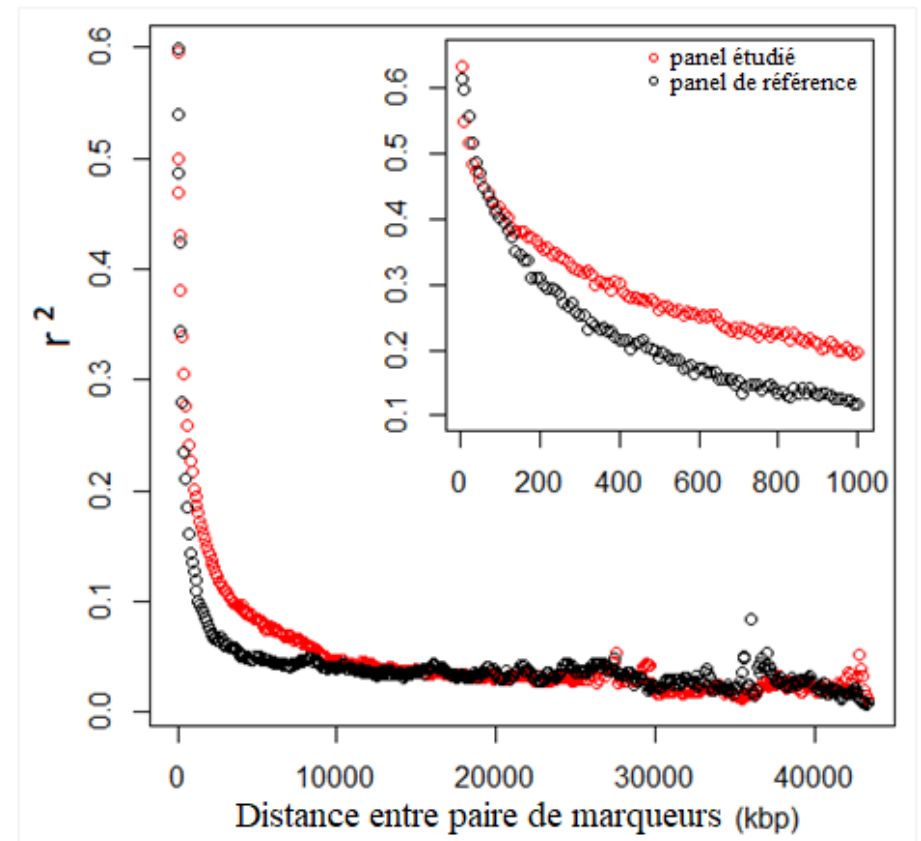


Figure 29: Comparaison des courbes d'extinction du déséquilibre de liaison entre le panel de 190 variétés de riz utilisées dans cette étude (coloré en rouge) et le panel de référence du groupe japonica tropical (coloré en noir)

Chaque point correspond à la moyenne du déséquilibre de liaison entre paires de marqueurs pour chaque compartiment de 100 kb sur la totalité de la longueur des chromosomes (cadre principal) ou pour chaque compartiment de 10 kb sur une distance maximum de 1000 kb (cadre zoomé).

Le panel de référence du groupe japonica tropical a été étudié par Raboin et *al.* (2016).

appartient au groupe *japonica* tempéré. Seules deux variétés sont clairement liées au groupe *indica*. Une trentaine de variétés sur les 190 présentent un certain niveau de mélange (admixture) entre le groupe *indica* et *japonica*. L'arbre de la diversité génétique (« NJ tree ») des 190 variétés du panel de cette étude est présenté en complément (Annexe 5). Le faible niveau de structuration génétique dans ce panel est confirmé par la seule différenciation des quelques variétés à fort fond génétique *indica*. Le regroupement de variétés est principalement dû à l'apparentement des variétés partageant partiellement ou totalement les mêmes parents. En conséquence, les variétés issues d'un même programme de sélection ont tendance à se regrouper (Annexe 5).

En moyenne, tous chromosomes confondus, le déséquilibre de liaison atteint la moitié de sa valeur initiale à environ 300 kb dans le panel de 190 variétés utilisées dans cette étude, contre moins de 200 kb dans un panel mondial de référence de variétés *japonica tropical* (Raboin et al., 2016). Le  $DL^{112}$  s'éteint à une valeur de  $r^2$  de 0,2 en 1000 kb dans notre panel et en 400 kb dans le panel de référence (Figure 29).

Le DL est fort dans le panel de 190 variétés par rapport au panel de référence *japonica tropical*. Dans cette étude, 38390 marqueurs SNP ont été utilisés, ils présentent une distance moyenne de 11 kb entre marqueurs adjacents, ce qui est bien inférieur à la distance d'extinction du DL. La densité des marqueurs utilisée pour différentes analyses GWAS du riz varie de 0,06 à 325,10 kb (Zhang et al., 2016). Compte tenu de l'ampleur du déséquilibre de liaison, la couverture du génome devrait convenir à la détection des associations marqueurs-caractères les plus intéressantes par GWAS, mais avec une résolution relativement faible. Yano et al. (2016) ont utilisé un panel de taille comparable au notre, de 176 variétés de *japonica tempérés* présentant un degré de DL élevé (445 kb) et ont pu identifier de nouveaux gènes influençant les caractères agronomiques, mais ils ont eu une densité de marqueurs plus élevée (plus de 400 k SNP) qui améliore la puissance de leur GWAS (Gordon et Finch, 2005).

### III.3.3. Validation de l'association marqueur-caractère à travers 4 gènes candidats (GW5, GS3, Awn1 et Glabrous 1)

Pour évaluer le potentiel de cette approche GWAS pour identifier les gènes responsables de la variation des caractères mesurés, une analyse d'association sur des caractères morphologiques simples du grain est effectuée. Il s'agit de la longueur de l'aristation, la pilosité du grain, la longueur du grain et la largeur du grain. GWAS a permis de détecter des signaux d'association situés à proximité de gènes identifiés précédemment et impliqués dans le polymorphisme de quatre caractères morphologiques du grain, ce sont le gène GW5 (Shomura et al., 2008), le gène GS3 (Fan et al., 2006), le gène Awn1 (Luo et al., 2013) et le gène Glabrous 1 (Angeles-Shim et al., 2012).

---

<sup>112</sup> Déséquilibre de liaison



Pour la longueur de l'aristation, 63 SNPs sur les chromosomes 4 et 11, significatifs à  $p < 10^{-4}$  sont détectés. Une région génomique sur le chromosome 4 révèle de forts signaux d'association entourant Awn1, un gène contrôlant l'élongation de l'aristation chez le riz. Celle-ci représente un segment chromosomique important de plus de 4 Mb (Figure 30). La distance entre le gène Awn1 (Os04g28280; Chr4\_16732393) et le SNP le plus significatif (Chr4\_17466245) détecté à  $-\log P = 7,3$  est de 733 kb.

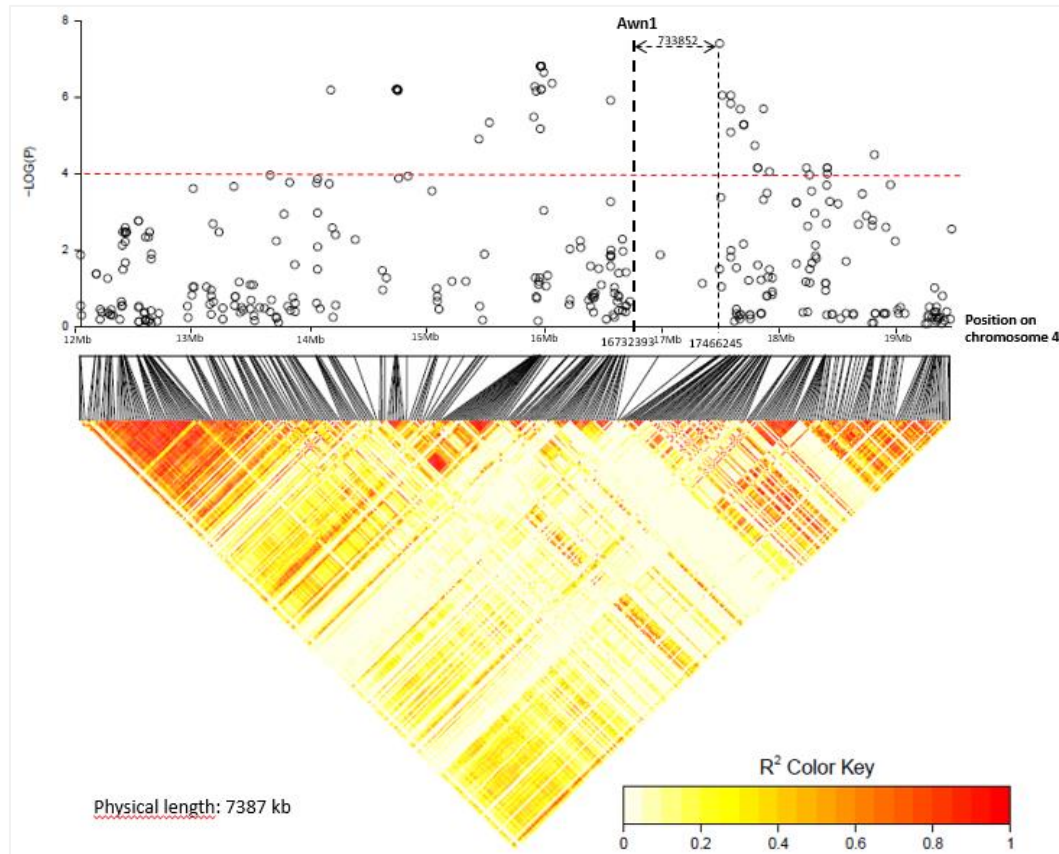


Figure 30: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène Awn1 de longueur de l'aristation du grain

Pour la pilosité du grain, une région génomique est identifiée au niveau du chromosome 5, comprenant 44 SNP significatifs à  $p < 10^{-4}$  sur 600 kb. Cette région comprend la position du gène Glabrous 1 (Os05g0118700; Chr5\_977812), un gène impliqué dans la pilosité des glumes de riz. Le SNP le plus significatif (Chr5\_1061537) détecté à  $-\log P = 8,5$  est situé à 83 kb (Figure 31) de ce gène.

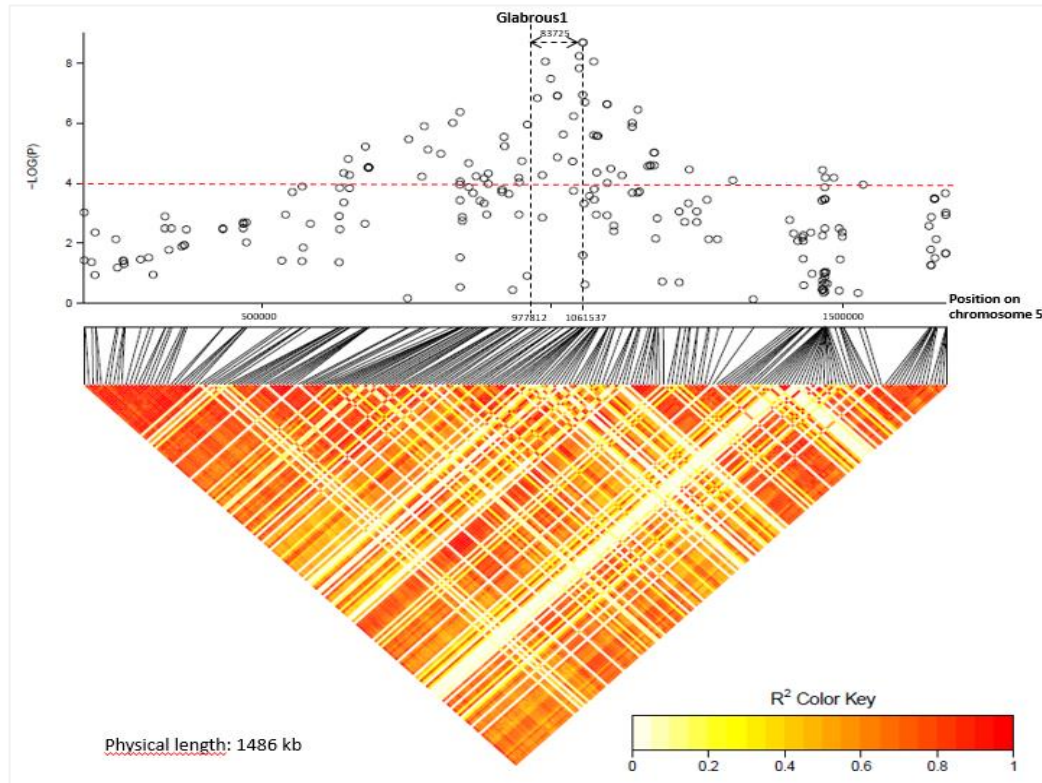


Figure 31: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène Glabrous 1 de la pilosité du grain

Pour la longueur du grain, une région génomique identifiée sur le chromosome 3 coïncide avec le GS3, un gène précédemment identifié et impliqué dans la taille du grain (Figure 32). Le SNP le plus significatif (Chr3\_16790082) est cartographié à proximité du gène GS3 (Os03g29350; Chr3\_16695922). Il est détecté à  $-\log P = 6,17$ , à 94 kb du gène GS3 et explique 13 % de la variation phénotypique totale de la longueur du grain.

Pour la largeur du grain, une région génomique au niveau du chromosome 5 a révélé de forts signaux d'association entourant le gène GW5, qui est impliqué dans la taille du grain (Figure 33). Le SNP le plus significatif (Chr5\_5391748) détecté à  $-\log P = 6,4$  est situé à 26 kb du gène GW5 (Os05g09520; Chr5\_5365520) et explique 11,7% de la variation phénotypique totale de la largeur du grain.

Des associations marqueur-caractère sont détectées à proximité de quatre gènes connus et précédemment caractérisés à l'aide de mutants ou de cartographie fine. Cependant, l'analyse fine de ces signaux d'association a révélé une résolution fluctuante en fonction du déséquilibre de liaison local. La distance entre les signaux les plus forts et les gènes causatifs varie entre 26 kb et 733 kb. Ce niveau de précision rend difficile l'identification sans équivoque de gènes responsables associés aux signaux détectés. Seulement dans le cas de la largeur du grain, un marqueur significatif a pu être détecté, bien qu'il ne soit pas le plus significatif, dans le gène connu GW5.

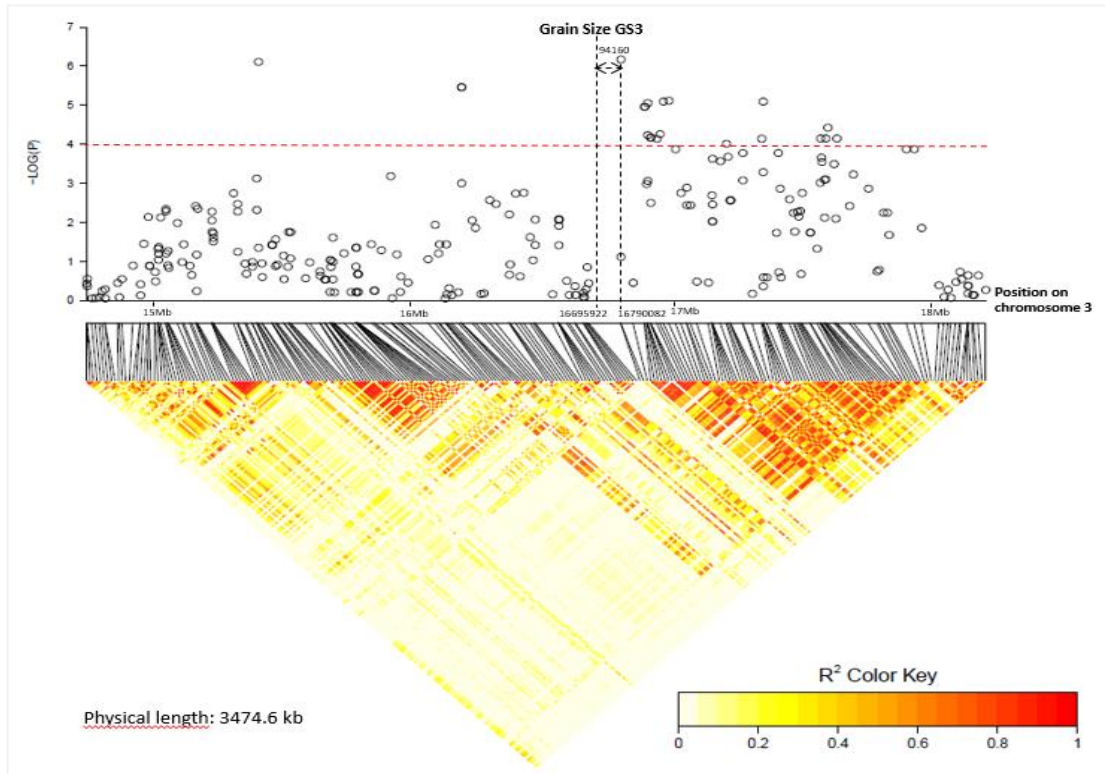


Figure 32: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène GS3 de la longueur du grain

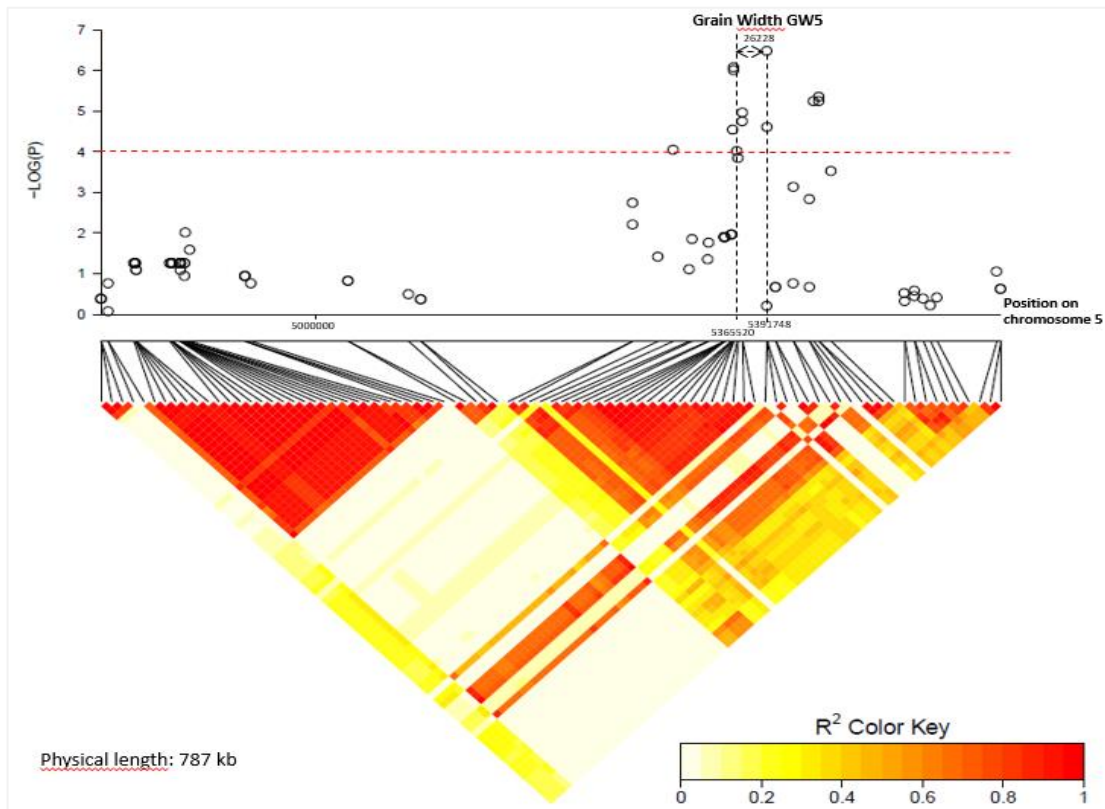


Figure 33: Manhattan plot et profil du déséquilibre de liaison (LD heat map) autour du gène GW5 de la largeur du grain

### III.3.4. Analyse GWAS de NUE et d'autres caractères agronomiques

Un total de 306 SNP significatifs associés aux 21 caractères agronomiques mesurés sont obtenus à partir de l'analyse GWAS à une valeur de  $-\log p < 10^{-4}$ . Ces associations marqueurs-caractères significatives correspondent à 47 régions haplotypiques (lors du regroupement de marqueurs dans un DL élevé) et à 29 marqueurs SNP isolés, dispersés sur les 12 chromosomes. 180 de ces SNP sont situés dans des gènes putatifs (7<sup>ème</sup> version du projet d'annotation du génome du riz MSU). Toutefois, seuls ceux qui pourraient être pertinents pour le caractère analysé sont présentés dans le tableau 16. Les variétés sont évaluées à deux niveaux d'azote (HN et LN) et 40 SNP significatifs sont détectés uniquement en HN, 59 uniquement en LN et 209 SNP significatifs (soit 68%) sont détectés simultanément en HN et LN (données non présentées).

#### ***Rendement en grains, composantes du rendement et autres caractères agronomiques***

La date de floraison est associée à un total de 12 SNP à  $p < 10^{-4}$ . Ces associations correspondent à 4 régions haplotypiques sur les chromosomes 1, 2 et 3 et à un marqueur isolé sur le chromosome 3. Une de ces régions sur le chromosome 3 a révélé le signal d'association le plus élevé de la présente étude ( $-\log P = 8,81$  à Chr3\_1424348) et correspond à un effet majeur expliquant jusqu'à 21,8% de la variation phénotypique du caractère.

Le rendement en grains est disséqué en quatre composantes qui sont le nombre de panicules par mètre carré (PANM2), le nombre d'épillets par panicule (SPIPAN), le pourcentage de grains pleins (FG) et le poids de mille grains (TGW). Pour PANM2, 57 SNP sont significatifs à  $p < 10^{-4}$ . Ces associations correspondent à trois régions haplotypiques et à deux marqueurs isolés. Une région haplotypique sur le chromosome 4 comprend 53 marqueurs SNPs sur les 57 et représente un segment chromosomique important de 2,2 Mb. L'association la plus significative dans ce segment est située à Chr4\_31359978 et explique 12% de la variation de PANM2. Pour SPIPAN, seuls 3 SNPs sont associés de manière significative sur les chromosomes 2, 4 et 12. Pour FG, 18 SNPs sont détectés sur les chromosomes 1, 2, 3, 4, 9 et 11, correspondant à sept haplotypes et à deux marqueurs isolés. Pour TGW, 26 SNPs significatifs sont trouvés significativement associés. Ces associations correspondent à 7 régions haplotypiques réparties sur les chromosomes 2, 3, 6, 10, 11 et 12. Les signaux d'association détectés pour TGW sur le chromosome 3 (le pic le plus élevé, Chr3\_16790082, détecté à  $-\log P = 6,17$ ) colocalisent avec les signaux détectés pour la longueur du grain (GL) et avec GS3, un gène préalablement identifié, impliqué dans la taille des grains, comme indiqué dans la partie précédente. Bien que 104 associations marqueurs-caractères au total aient été révélées par GWAS pour les quatre composantes de rendement, seuls quatre SNPs sont associés de manière significative au rendement en grains. Ils appartiennent à deux haplotypes sur les chromosomes 6 et 11. Trois caractères correspondant à la taille des grains qui pourraient être liés à TGW ont également été étudiés. Pour la longueur du grain, 28 associations marqueurs-caractères appartenant à 4 groupes haplotypiques et trois marqueurs isolés sont détectés sur les chromosomes 2, 3, 4, 9 et 12. L'un de ces groupes sur le chromosome

3 est étroitement associé au gène GS3, comme indiqué ci-dessus. Pour la largeur de grain, 27 SNPs sont détectés, correspondant à six groupes haplotypiques et à un marqueur isolé sur les chromosomes 2, 5, 6 et 12. L'un de ces groupes sur le chromosome 5 est étroitement associé au gène GW5, comme indiqué ci-dessus. Enfin, pour l'épaisseur du grain, 10 associations marqueurs-caractères correspondant à deux haplotypes et à un marqueur isolé sur les chromosomes 1, 3 et 12 sont détectées.

Deux indicateurs de la biomasse ont été étudiés, ce sont le rendement en pailles (SY) et la hauteur de la plante (PH). SY est associé de manière significative à 9 marqueurs SNP appartenant à quatre haplotypes et à un marqueur isolé. Ils sont situés sur les chromosomes 1, 2, 8 et 11. Pour PH, 24 marqueurs SNP sont détectés, appartenant à 8 haplotypes et un marqueur isolé, sur les chromosomes 3, 4, 5, 7 et 10. Pour l'indice de récolte, qui mesure la répartition entre grains et pailles de la plante, 49 signaux d'association significatifs, appartenant à 12 haplotypes et 6 marqueurs isolés sont identifiés sur les chromosomes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11.

#### ***Efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE), composantes de NUE et caractères liés à l'azote***

NUE est décomposé en efficacité de l'absorption d'azote (NUPE) et efficacité de conversion de l'azote (NUTE). Pour NUPE, 5 SNPs <sup>113</sup> significatifs appartenant à deux haplotypes sur les chromosomes 5 et 6 sont identifiés. Pour NUTE, 28 SNPs sont détectés, ils appartiennent à 10 haplotypes et un marqueur isolé et se situent sur les chromosomes 1, 3, 4, 6, 9, 10 et 11. Cependant, seuls quatre marqueurs SNP appartenant à deux haplotypes et un marqueur isolé sont détectés pour NUE sur chromosomes 6, 7 et 11. Les quatre autres caractères liés à l'azote étudiés sont la teneur en azote des pailles, la teneur en azote des grains, l'indice de récolte azoté et l'azote total absorbé par la plante. Pour la teneur en azote des pailles, seuls deux SNPs sont détectés, l'un appartient à un haplotype sur le chromosome 1 et l'autre est isolé sur le chromosome 9. Pour la teneur en azote des grains, 26 SNPs appartenant à cinq haplotypes et quatre marqueurs isolés sont détectés sur les chromosomes 1, 4, 5, 10, 11 et 12. Pour l'indice de récolte azoté, 31 SNPs appartenant à 9 haplotypes et trois marqueurs isolés sont détectés sur les chromosomes 1, 4, 5, 6, 9, 11 et 12. Pour l'azote total absorbé par la plante, 10 SNPs appartenant à trois haplotypes sur les chromosomes 1, 5 et 6 sont identifiés.

#### **III.3.5. Coïncidence entre groupes haplotypiques (QTLs) associés à différents caractères**

Les coïncidences entre les SNPs détectés pour différents caractères sont synthétisées dans le tableau 15. Certaines de ces coïncidences sont assez simples et explicites, comme la colocalisation des signaux d'association pour HI<sup>114</sup> et NHI<sup>115</sup> au sein de 6 haplotypes (21 SNPs significatifs en commun).

---

<sup>113</sup> Polymorphisme d'un seul nucléotide

<sup>114</sup> Indice de récolte

<sup>115</sup> Indice de récolte azoté

Tableau 15: Nombre d'occurrences de marqueurs détectés en commun pour chaque combinaison de caractère (partie haute et droite du tableau) et nombre d'occurrences de colocalisations de signaux d'associations dans un même haplotype pour chaque combinaison de caractères (partie basse et gauche du tableau)

	nb haplotypes				GY	PANM2	SPIPAN	FG	TGW	DTFL	GL	GW	GT	PH	SY	HI	NUE	NUPE	NUTE	SNC	GNC	TNUP	NHI
nb SNP					57	3	18	26	12	28	27	10	24	9	49	4	5	28	2	26	10	31	
GY															1	3	1						1
PANM2	3	1												3									
SPIPAN	3		1																				
FG	7		2	1					2							1			1				1
TGW	7			1						3													
DTFL	4				4										1	4			1				5
GL	4							2															
GW	6			1		1							1										
GT	2											1											
PH	8		1		2		1			1	1												
SY	4				2		1			1													1
HI	12	2	1		2	1	2							3	1		1	1	6				21
NUE	2	2	1													2			1				1
NUPE	2	1	1												1	1						5	
NUTE	10	2	1		4		3	1							1	4	2	1			13		6
SNC	1				1																		
GNC	5	1												1		1	1	1	3				
TNUP	3	1	1												1	1	1	2	1		1		
NHI	9	1			2		2							2	1	6	1		4		1		

Les signaux d'association pour NUTE et HI (ou NHI) colocalisent dans quatre haplotypes (6 SNPs significatifs en commun) confirmant, au niveau génétique, la forte corrélation phénotypique observée entre NUE et HI (Rakotoson et *al.*, 2017).

Les signaux d'association pour NUTE et FG colocalisent dans quatre haplotypes. DTFL<sup>116</sup> et FG<sup>117</sup> sont également regroupés au sein de quatre haplotypes. Ceci est en partie une relation transitive car les variétés tardives présentent souvent une faible fertilité, qui peut à son tour induire un NUTE faible. Des associations détectées pour DTFL, NUTE et FG sont colocalisées dans deux haplotypes. Trois haplotypes communs pour NUTE et GNC (13 SNPs significatifs en commun) sont également identifiés. Pour TGW<sup>118</sup>, une occurrence de colocalisation avec un haplotype de GW<sup>119</sup> et deux occurrences pour TGW et GL<sup>120</sup> ont été identifiées. En raison du très faible nombre de SNPs détecté pour des caractères quantitatifs complexes

<sup>116</sup> Date de floraison  
<sup>117</sup> Pourcentage de grains pleins  
<sup>118</sup> Poids de mille grains  
<sup>119</sup> Epaisseur du grain  
<sup>120</sup> Longueur du grain

tels que le rendement en grains le NUE par rapport au nombre de SNPs détectés pour leurs caractères constitutifs, nous n'avons pas pu identifier beaucoup de coïncidences entre les haplotypes identifiés pour ces caractères et ceux identifiés pour leurs composantes. Cela confirme l'intérêt de décomposer les caractères complexes en caractères plus simples et plus héréditaires.

Pour NUE, une occurrence de colocalisation avec un haplotype de NUPE<sup>121</sup> et deux occurrences pour NUE et NUTE<sup>122</sup> ont été néanmoins trouvées. Cependant, aucune coïncidence entre les haplotypes identifiés pour NUTE et pour NUPE, ni de SNP communs n'a été trouvée. Ceci est conforme à l'absence de corrélation phénotypique significative entre NUPE et NUTE, que ce soit à faible ou fort niveau d'azote, observée par Rakotoson et *al.* (2017) et suggère que leur contrôle génétique est essentiellement indépendant. Aucune coïncidence entre les haplotypes identifiés pour PH<sup>123</sup> et SY<sup>124</sup>, ni de SNP commun n'a été détectée. Il convient de souligner trois haplotypes intéressants qui semblent présenter des effets pléiotropiques. L'un est situé sur le chromosome 1 (2958149-4958939) et englobe des associations significatives marqueur-caractère détectées pour DTFL<sup>125</sup>, NHI<sup>126</sup>, HI<sup>127</sup>, FG<sup>128</sup>, SY et NUTE<sup>129</sup>. Le second est situé sur le chromosome 6 (21460579-27015435) et englobe des associations marqueurs-caractères détectées pour GY<sup>130</sup>, NUE, HI, TNUP<sup>131</sup>, NUPE<sup>132</sup>, PANM2<sup>133</sup>. Le troisième est situé sur le chromosome 11 (19200467-22302701) et englobe des associations marqueurs-caractères détectées pour GY, NUE, NUTE, NHI, HI, GNC<sup>134</sup>. Les quatre seuls signaux détectés pour GY sont situés dans deux de ces haplotypes pléiotropiques sur les chromosomes 6 et 11.

### III.3.6. Identification des gènes candidats

La date de floraison est un caractère complexe et important déterminant l'adaptation d'un génotype à son environnement. Dans cette étude, nous avons identifié quatre groupes haplotypiques associés à DTFL sur les chromosomes 1, 2 et 3. L'un de ces haplotypes présente un effet majeur sur DTFL, expliquant jusqu'à 22% de la variation phénotypique de ce caractère (Tableau 16). Une distance physique de 82 kb est observée entre un SNP (Chr3\_1352456) de cet haplotype et le DTH3, un gène connu pour la date d'épiaison (Os03g03070, Chr3\_1269856, Lee et *al.*, 2004). Ce SNP est hautement significatif (-logP=8,15). Cependant, une association plus étroite (10 kb) et plus forte (-logP = 8,84) est également détectée dans ce même haplotype entre un SNP (Chr3\_1395165) et un autre gène candidat intéressant,

---

<sup>121</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>122</sup> Efficacité de conversion de l'azote

<sup>123</sup> Hauteur de la plante

<sup>124</sup> Rendement en pailles

<sup>125</sup> Date de floraison

<sup>126</sup> Indice de récolte azoté

<sup>127</sup> Indice de récolte

<sup>128</sup> Pourcentage de grains pleins

<sup>129</sup> Efficacité de conversion de l'azote

<sup>130</sup> Rendement en grains

<sup>131</sup> Azote total absorbé par la plante

<sup>132</sup> Efficacité de l'absorption de l'azote

<sup>133</sup> Nombre de panicules/m<sup>2</sup>

<sup>134</sup> Teneur en azote des grains

TKL\_IRAK\_CrRLK1L-1.6 (Os03g03280). Il est à noter qu'un autre haplotype identifié pour DTFL sur le chromosome 1 met également en évidence un gène candidat de la même famille (Os01g06280, TKL\_IRAK\_CrRLK1L-1.4), situé entre deux SNP détectés (Chr1\_2972304 à 13 kb du gène et Chr1\_3028472 à 43 kb du gène). Le gène récepteur kinase CrRLK1L (récepteur ressemblant à la kinase de *Catharanthus roseus*) est impliqué dans de nombreux processus biologiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, CURVY1, un gène de la famille CrRLK1L est impliqué dans la date de floraison (Gachomo et al., 2014). Chez *Oryza sativa*, la phylogénomique a identifié 16 gènes homologues de CrRLK1L avec une régulation circadienne de type Gigantea de leur expression (Nguyen et al., 2014). Ils proposent un modèle fonctionnel pour le rôle de OsCrRLK1L2 dans la régulation de la voie de signalisation de la date de floraison ou des rythmes circadiens.

Trois autres SNP associés à DTFL<sup>135</sup> sont situés à proximité des gènes candidats impliqués dans le contrôle de la date de floraison. Ce sont Chr2\_2843055 situé à 38 kb de OsVIL2 (Os02g05840; Yang et al., 2013), Chr3\_1352456 situé à 82 kb de DTH3 (Os03g03070; Lee et al., 2004) et Chr\_3845920 situé à 47 kb de OsSUT1 (Os03g07480; Takeda et al., 2001). Plusieurs études ont indiqué que l'horloge circadienne du riz contrôlait plusieurs processus de développement tel que la date de floraison (Yano et al., 2000; Izawa, 2012).

Pour les caractères liés à NUE, nous avons identifié un nombre limité de gènes candidats malgré qu'il s'agisse de l'objectif principal de notre étude. Deux gènes de transport de nitrate à haute affinité sont proches de SNP associés à la teneur en azote des grains sur le chromosome 1. OsNRT2.1 (Chr1\_634328, Os01g02170; Yan et al., 2011) est situé à 39 kb du SNP Chr1\_594602. OsNRT2.3a (Chr1\_29188984, Os01g50820; Tang et al., 2012) est situé à 23 kb du SNP significatif Chr1\_29212814. Chr1\_29135405, le marqueur le plus proche d'OsNRT2.3a (à 53 kb) est associé à la fois à GNC<sup>136</sup> et à NUTE<sup>137</sup> (Tableau 16). OsNRT2.1 a déjà été identifié comme un gène améliorant le NUE (Chen et al., 2016). Il a aussi été démontré que la surexpression de OsNRT2.3b améliore le rendement en grains et le NUE (Fan et al., 2016).

Quelques gènes associés à la remobilisation de l'azote sont localisés à proximité de marqueurs SNP associés à des caractères liés à NUE, tels que NHI<sup>138</sup>, NUTE et SNC<sup>139</sup>. OsDOS (Os01g09620; Kong et al., 2006), impliqué dans le retard de la sénescence des feuilles chez le riz, est situé à 10 kb du SNP chr1\_4958939 qui est associé à NHI. Nyc1 (Os01g12710; Kusaba et al., 2007), impliqué dans la dégradation de la chlorophylle au cours de la sénescence, est situé à 284 kb du SNP chr1\_7309207 qui est associé à SNC. OsRBCS2 (Os12g17600; Ogawa et al., 2011), impliqué dans la synthèse de Rubisco, est situé à 166 kb du SNP Chr12\_9914173 qui est associé à NHI. Un autre gène putatif, Os11g32770, annoté «précurseur

<sup>135</sup> Date de floraison

<sup>136</sup> Teneur en azote des grains

<sup>137</sup> Efficacité de conversion de l'azote

<sup>138</sup> Indice de récolte azoté

<sup>139</sup> Teneur en azote des pailles



de la grande chaîne de la ribulose biphosphate carboxylase», est localisé à 7 kb de SNP Chr11\_19365597 qui est associé à NHI, NUTE et HI. La Rubisco est la principale source d'azote des feuilles au cours du processus de la remobilisation l'azote.

Quelques gènes candidats pour le pourcentage de grains pleins (FG) peuvent être proposés. Os01g12420, une kinase de type récepteur, contient un SNP associé à FG. Il s'agit d'un gène de la même famille que crinky4 (Pu et *al.*, 2012) requis pour maintenir la fermeture de la paléa et la lemma et la fertilité du riz. Os02g12550, un gène putatif codant pour le cytochrome P450 contient 5 SNPs associés à FG (6559647, 6559650, 6559652, 6559654, 6559655 sur le chromosome 2). Le cytochrome P450 est similaire au CYP70A3 (Yang et *al.*, 2018), essentiel au développement de la cuticule de l'anthere et de l'exine du pollen dont la mutation peut provoquer un phénotype de stérilité mâle sans pollen. PTC1 (Os09g27620; Li et *al.*, 2011), un gène impliqué dans la mort des cellules tapétales et le développement du pollen, est situé à 180 kb du SNP chr9\_16968338 qui est associé à FG.

Pour les caractéristiques de la taille des grains, sept gènes candidats distincts peuvent être proposés, y compris les gènes GS3 et GW5 déjà discutés. OsMPS (Os02g40530, Schmidt et *al.*, 2013) est situé à 71 kb du SNP chr2\_24510877 qui est associé au poids de mille grains. Deux gènes candidats correspondant à des protéines de la famille présentant des motifs de liaison à la calmoduline IQ comme le gène GW5. Ce sont Os03g23960 qui contient un SNP chr3\_13604676 associé à l'épaisseur du grain et Os11g31060 qui est situé à 5 kb du SNP chr11\_18075204 associé au poids de mille grains. Os03g26910, un gène de type glycosyl hydrolase putatif comme GIF1 (Wang et *al.*, 2008), impliqué dans le remplissage du grain de riz, est situé à 7 kb du SNP Chr3\_15389524 associé à la longueur du grain. Enfin, GS5, un gène régulant la taille des grains (Os05g06660; Li et *al.*, 2011) est localisé à 67 kb du SNP chr5\_3506138 associé à la largeur du grain.

Pour les trois haplotypes intéressants présentant des effets pléiotropiques sur les chromosomes 1, 6 et 11, certains gènes candidats peuvent être mis en exergue. Dans le premier haplotype sur le chromosome 1 (2958149- 4958939), le gène Os01g06220, un récepteur de la gibbérelline, contient un SNP chr1\_2958149 associé à DTFL<sup>140</sup>, NHI<sup>141</sup> et HI<sup>142</sup> et à côté de celui-ci, le gène Os01g06230, un membre de la famille des gènes SAUR réceptifs à l'auxine, contient un SNP chr1\_62616 associé DTFL, NHI et HI. De plus, dans ce même haplotype, nous avons trouvé également Os01g06280, un récepteur kinase CrRLK1L dont nous avons déjà évoqué l'implication potentielle dans le contrôle de la date de floraison.

---

<sup>140</sup> Date de floraison

<sup>141</sup> Indice de récolte azoté

<sup>142</sup> Indice de récolte

Tableau 16: Liste des associations marqueurs-caractères significatives détectées dans le panel pour les 21 caractères agronomiques

Chr	Position du SNP	Caractères	Gène identifié				Allèle majeur	Allèle mineur	LOD *	R <sup>2</sup> **	q <sup>***</sup> min
			Nom	LOC	Fonction	Position					
1	594602	GNC	OsNRT2.1	Os01g02170	High-affinity nitrate transporter 2.1	634328	179	11	4,22	9,01%	0,68
1	1562879	NUTE					128	62	4,04	8,01%	0,15
1	2531118	HI					150	40	4,15	7,92%	0,22
1	2575670	HI					141	49	4,39	8,50%	0,13
1	2924399	HI					169	21	4,26	8,10%	0,09
1	2958149	DTFL, NHI, HI		Os01g06220	gibberellin receptor <i>GID1L2</i>	<b>2958149</b>	171	19	4,33	8,35%	0,08
1	2961416	FG, DTFL, NHI, HI		Os01g06230	OsSAUR1 - Auxin-responsive SAUR gene family member	<b>2961416</b>	172	18	4,97	10,34%	0,03
1	2972214	NHI, DTFL, HI					171	19	5,09	10,64%	0,03
1	2972304	DTFL, NHI					178	12	4,77	8,83%	0,13
1	3028472	DTFL, SY, NHI, HI		Os01g06280	TKL_IRAK_CrRLK1L-1.4	2985172	177	13	5,25	10,38%	0,03
1	3031975	NUTE, NHI, HI					178	12	5,51	10,99%	0,03
1	3034970	NUTE, NHI, HI					181	9	6,00	11,83%	0,02
1	4825760	NUTE, NHI, HI					181	9	7,26	14,88%	0,00
1	4958939	NHI	OsDOS	Os01g09620	JA sensitivity. Delay leaf senescence	4949047	173	17	4,07	7,46%	0,17
1	5092077	NUTE, NHI					182	8	5,42	10,47%	0,05
1	6386004	GT					158	32	4,84	9,44%	0,48
1	6394250	GT					159	31	4,49	8,63%	0,54
1	6788173	FG	<i>like crinkly4</i>	Os01g12420	receptor-like protein kinase	<b>6788173</b>	157	33	4,03	6,92%	0,54
1	6798403	FG	<i>like crinkly4</i>	Os01g12430	receptor-like protein kinase	6792688	157	33	4,15	7,92%	0,53
1	7309207	SNC	<i>nyc1</i>	Os01g12710	Chlorophyll degradation during senescence.	7024297	104	86	4,09	8,66%	0,55
1	14798901	NHI					179	11	4,02	7,20%	0,21
1	14798903	NHI					179	11	4,02	7,20%	0,21
1	14798906	NHI					179	11	4,02	7,20%	0,21
1	14798910	NHI					179	11	4,02	7,20%	0,21
1	29135405	GNC, NUTE					179	11	4,76	10,43%	0,13
1	29212814	GNC	OsNRT2.3a	Os01g50820	High affinity nitrate transporter / N utilization	29188984	177	13	4,01	8,49%	0,13
1	33331630	SY					155	35	4,23	8,80%	0,47
1	33869161	SY					154	36	4,06	8,38%	0,47
1	34618023	PANM2					182	8	4,16	7,04%	0,07
1	35227466	SY					134	56	4,67	9,90%	0,47
1	35227489	TNUP					141	49	4,03	8,24%	0,73
1	37638238	SY					157	33	4,03	8,30%	0,47
2	2843055	DTFL	lc2; OsVIL2	Os02g05840	VIL2 protein; Flowering time independent of day length.	2881463	136	54	4,19	9,03%	0,28

2	4686804	SPIPAN					151	39	4,29	9,26%	0,47
2	6559647	FG	<i>like CYP703A3</i>	Os02g12550	cytochrome P450	<b>6559647</b>	173	17	4,07	8,52%	0,33
2	6559650	FG	"	"	"	<b>6559650</b>	173	17	4,07	8,52%	0,33
2	6559652	FG	"	"	"	<b>6559652</b>	173	17	4,07	8,52%	0,33
2	6559654	FG	"	"	"	<b>6559654</b>	173	17	4,07	8,52%	0,33
2	6559655	FG	"	"	"	<b>6559655</b>	173	17	4,07	8,52%	0,33
2	7427924	GL					179	11	4,80	10,10%	0,13
2	7595394	FG					177	13	4,16	8,88%	0,66
2	16834617	PANM2					178	12	4,42	8,12%	0,49
2	24480078	TGW					155	35	4,17	7,27%	0,19
2	24510877	TGW	OsMPS	Os02g40530	MYB family transcription factor; grain size	24582332	121	69	4,09	8,06%	0,19
2	25585083	GW					177	13	4,35	7,50%	0,15
2	25777798	GW					179	11	4,19	7,04%	0,13
2	25863892	GW					175	15	4,20	7,11%	0,20
2	27229192	GW					149	41	4,18	7,03%	0,22
2	29548119	SY					157	33	4,24	8,82%	0,47
2	30673197	FG					179	11	4,48	8,80%	0,33
2	33297189	FG					180	10	4,41	9,37%	0,33
2	33415092	FG					179	11	4,09	8,71%	0,50
3	1049272	DTFL					124	66	5,13	11,51%	0,06
3	1352456	DTFL	DTH3	Os03g03070	transcription factor	1269856	157	33	8,15	19,94%	0,00
3	1356326	DTFL					164	26	8,12	19,87%	0,00
3	1395165	DTFL, FG, NUTE	TKL_IRAK_CrRLK1L-1,6	Os03g03280		1405624	160	30	7,01	16,65%	0,00
3	1424348	DTFL					154	36	8,81	21,88%	0,00
3	2642399	FG					154	36	4,69	10,23%	0,33
3	3425919	PH	oscow1; nal7	Os03g06654	flavin monooxygenase, putative; dwarfism	3358585	167	23	4,88	6,66%	0,20
3	3602444	PH					175	15	4,27	5,68%	0,20
3	3602862	PH					174	16	4,23	5,62%	0,23
3	3677867	PH				10330	174	16	4,23	5,62%	0,23
3	3728449	PH	OsDof12	Os03g07360	Flowering time under long day condition; plant height	3738779	175	15	4,27	5,68%	0,20
3	3845920	DTFL	OsSUT1	Os03g07480	Flowering time and dwarfism	3798871	176	14	5,34	12,06%	0,03
3	4042579	PH					177	13	4,06	5,36%	0,23
3	13264119	GW, GT					170	20	4,69	10,05%	0,46
3	13316314	GT					154	36	4,28	9,02%	0,46
3	13318108	GT					173	17	4,14	8,68%	0,46
3	13604676	GT	<i>like GW5</i>	Os03g23960	IQ calmodulin-binding motif family protein	<b>13604676</b>	171	19	4,49	9,56%	0,46
3	13656604	GT					159	31	4,38	9,28%	0,46

3	13666961	GW					155	35	4,23	7,35%	0,20
3	13713223	GT					173	17	4,05	8,45%	0,49
3	13738109	GT					172	18	4,20	8,83%	0,46
3	15389524	GL	like GIF1	Os03g26910	uncharacterized glycosyl hydrolase	15382030	121	69	6,11	13,40%	0,02
3	16174183	TGW, GL					135	55	5,46	11,75%	0,03
3	16174184	TGW, GL					135	55	5,46	11,75%	0,03
3	16414381	TGW					147	43	4,23	8,39%	0,20
3	16790082	TGW, GL	<b>GS3</b>	Os03g29350	Von Willebrand factor type A domain containing protein	16695922	152	38	6,17	13,58%	0,02
3	16881568	GL					172	18	4,96	10,48%	0,04
3	16881584	GL					172	18	4,96	10,48%	0,04
3	16893697	GL					172	18	4,23	8,68%	0,14
3	16893771	GL					171	19	5,05	10,70%	0,04
3	16905338	GL					172	18	4,17	8,53%	0,14
3	16905346	GL					172	18	4,17	8,53%	0,14
3	16929069	GL					172	18	4,14	8,45%	0,14
3	16941151	GL					173	17	4,26	8,73%	0,13
3	16954242	GL					170	20	5,09	10,80%	0,04
3	16975586	GL					171	19	5,11	10,87%	0,04
3	17197639	GL					154	36	4,01	8,14%	0,16
3	17334289	GL					155	35	4,14	8,45%	0,14
3	17339722	GL					170	20	5,09	10,80%	0,04
3	17561589	GL					171	19	4,15	8,47%	0,14
3	17581278	GL					171	19	4,15	8,47%	0,14
3	17589421	GL					172	18	4,43	9,15%	0,13
3	17624867	GL					171	19	4,15	8,47%	0,14
3	31091486	HI					179	11	4,19	8,04%	0,23
3	35648563	GL					159	31	4,13	8,44%	0,14
3	36104232	FG					170	20	4,04	7,26%	0,53
4	6008932	GL					178	12	4,33	8,91%	0,13
4	11308392	PH					176	14	4,13	5,72%	0,20
4	14812790	GNC					175	15	4,06	8,60%	0,14
4	19850161	NUTE					182	8	5,16	11,49%	0,10
4	21610862	NHI, HI					165	25	5,02	11,17%	0,03
4	29966056	HI					177	13	4,01	7,86%	0,13
4	29968457	HI					177	13	4,01	7,86%	0,13
4	29968490	HI					178	12	4,18	8,25%	0,13
4	31050939	PANM2	osks1	Os04g52230	ent-kaurene synthase, chloroplast precursor; dwarfism	31026617	155	35	5,85	10,08%	0,02

4	31070568	PANM2	osks2	Os04g52240	terpene synthase, putative; dwarfism...		172	18	4,69	8,30%	0,05
4	31073279	PANM2					173	17	4,31	7,01%	0,07
4	31073284	PANM2					173	17	4,31	7,01%	0,07
4	31073285	PANM2					173	17	4,31	7,01%	0,07
4	31073290	PANM2					173	17	4,31	7,01%	0,07
4	31073296	PANM2					173	17	4,31	7,01%	0,07
4	31074152	PANM2					172	18	4,69	8,30%	0,05
4	31074269	PANM2					173	17	4,31	7,01%	0,07
4	31080257	PANM2					174	16	4,87	8,10%	0,05
4	31082743	PANM2					172	18	4,69	8,30%	0,05
4	31091534	PANM2					165	25	5,22	8,98%	0,03
4	31091552	PANM2					166	24	4,06	7,44%	0,09
4	31091558	PANM2					166	24	4,06	7,44%	0,09
4	31113077	PANM2					168	22	4,08	6,56%	0,07
4	31127313	PANM2					144	46	4,30	7,93%	0,07
4	31144421	PANM2					170	20	4,49	9,47%	0,09
4	31243064	PANM2					144	46	4,54	9,60%	0,09
4	31250082	PANM2					141	49	5,92	10,81%	0,02
4	31258594	PANM2					142	48	6,38	12,03%	0,01
4	31359978	PANM2					173	17	4,53	9,57%	0,10
4	31422585	PANM2					173	17	4,01	8,31%	0,11
4	31433075	PANM2					165	25	4,28	8,94%	0,07
4	31449324	PANM2					164	26	5,45	11,98%	0,05
4	31450434	PANM2					162	28	4,55	9,64%	0,07
4	31450557	PANM2, PH					159	31	5,70	11,57%	0,03
4	31453378	PANM2					166	24	4,88	10,49%	0,05
4	31547177	PH					182	8	5,08	7,14%	0,10
4	31577601	PANM2					166	24	4,36	7,11%	0,07
4	31669472	PANM2					182	8	4,12	7,38%	0,13
4	31751408	PANM2					167	23	4,20	8,78%	0,09
4	31958499	PANM2					166	24	4,68	8,07%	0,05
4	31963650	PANM2					164	26	5,17	10,46%	0,03
4	31963668	PANM2					164	26	5,17	10,46%	0,03
4	31963682	PANM2					164	26	5,17	10,46%	0,03
4	32000092	PANM2					149	41	4,18	8,19%	0,07
4	32007136	PANM2					166	24	4,73	9,66%	0,05
4	32008511	PANM2					165	25	4,30	9,03%	0,08
4	32010738	PANM2					163	27	4,36	9,16%	0,09

4	32019099	PANM2					166	24	4,10	8,53%	0,08
4	32019107	PANM2					166	24	4,10	8,53%	0,08
4	32019116	PANM2					166	24	4,10	8,53%	0,08
4	32059548	PANM2					168	22	5,26	11,43%	0,09
4	32251982	PANM2					165	25	4,30	9,03%	0,08
4	32338731	PANM2					177	13	4,22	8,85%	0,12
4	32409552	PANM2					157	33	4,07	8,43%	0,10
4	33214679	PH					166	24	4,01	5,62%	0,23
4	33229719	PH					166	24	4,01	5,62%	0,23
4	33229722	PH					166	24	4,01	5,62%	0,23
4	33260913	PANM2					150	40	4,48	8,67%	0,07
4	33263832	PANM2					149	41	4,15	8,65%	0,10
4	33299448	PANM2					150	40	4,22	8,84%	0,09
4	33308485	PANM2, PH					149	41	4,57	9,70%	0,07
4	33308552	PANM2					150	40	4,11	8,55%	0,09
4	33308554	PANM2					150	40	4,11	8,55%	0,09
4	33310750	PANM2, PH					149	41	4,57	9,70%	0,07
4	33310814	PANM2					151	39	4,20	8,73%	0,10
4	33427632	FG					178	12	4,05	8,27%	0,53
4	34640078	SPIPAN					169	21	4,15	8,91%	0,47
5	1442555	GNC					169	21	4,00	8,47%	0,14
5	2395571	TNUP, NUPE					128	62	4,12	8,45%	0,35
5	3506138	GW	GS5	Os05g06660	OsSCP26 - Putative Serine Carboxypeptidase homologue	3439210	157	33	5,09	9,16%	0,10
5	5309762	GW					158	32	4,05	6,81%	0,18
5	5361979	GW					113	77	4,55	7,67%	0,07
5	5362675	GW					112	78	6,01	10,69%	0,01
5	5362698	GW					114	76	6,08	11,12%	0,01
5	5365520	GW	GW5	Os05g09520	<b>IQ calmodulin-binding motif family protein</b>	<b>5365520</b>	114	76	4,02	6,95%	0,18
5	5370373	GW					112	78	4,75	8,39%	0,07
5	5370453	GW					111	79	4,97	8,67%	0,06
5	5391748	GW					122	68	6,48	11,70%	0,01
5	5391959	GW					120	70	4,61	7,90%	0,07
5	5432690	GW					123	67	5,25	9,10%	0,04
5	5437310	GW					122	68	5,36	9,55%	0,04
5	5437346	GW					123	67	5,25	9,10%	0,04
5	19533670	HI					157	33	4,36	8,86%	0,07
5	19646517	NHI					160	30	4,32	8,01%	0,14

5	19686629	PH	sdg; gid1	Os05g33730	dwarfism gibberelin sensitivity	19868419	181	9	4,82	7,00%	0,10
5	20077443	HI					155	35	4,17	8,23%	0,13
5	23584950	PH					182	8	4,27	6,03%	0,20
5	26375807	HI					181	9	5,34	11,04%	0,02
5	26375843	HI					181	9	5,34	11,04%	0,02
5	26375844	HI					181	9	5,34	11,04%	0,02
5	26375851	HI					181	9	5,34	11,04%	0,02
5	26375854	HI					181	9	5,34	11,04%	0,02
5	26386350	NHI, HI					182	8	5,92	12,49%	0,01
5	26386368	NHI, HI					182	8	5,92	12,49%	0,01
5	28200170	PH					176	14	5,04	7,17%	0,10
5	28200257	PH					176	14	4,46	6,16%	0,16
5	28200267	PH					176	14	4,46	6,16%	0,16
5	28239465	PH					174	16	5,59	7,86%	0,09
5	28273824	PH					173	17	4,49	6,41%	0,18
6	3319590	HI					140	50	4,06	7,72%	0,23
6	4333075	TGW					161	29	4,04	7,02%	0,19
6	4431300	TGW					162	28	4,66	8,30%	0,19
6	4539046	TGW					167	23	4,06	7,16%	0,19
6	4587552	TGW					177	13	4,16	7,38%	0,19
6	13109786	GW					140	50	4,63	7,84%	0,07
6	17947275	GW					138	52	4,28	7,14%	0,12
6	17965167	GW					139	51	4,50	7,58%	0,07
6	21460579	NUTE					179	11	4,04	8,01%	0,09
6	21981538	TNUP, NUPE					158	32	4,38	9,25%	0,38
6	21981539	TNUP, NUPE					158	32	4,38	9,25%	0,38
6	21981555	TNUP, NUPE					158	32	4,38	9,25%	0,38
6	21981979	TNUP					157	33	4,15	8,66%	0,38
6	21982001	TNUP					157	33	4,15	8,66%	0,38
6	22028211	TNUP	d35	Os06g37300	cytochrome P450; Dwarfism, Gibberellin biosynthesis	22020840	161	29	4,10	8,54%	0,38
6	22047685	TNUP					161	29	4,10	8,54%	0,38
6	22089331	TNUP, NUPE					162	28	4,48	9,49%	0,38
6	23132081	PANM2					180	10	4,09	7,39%	0,48
6	23769532	GY, NUE					162	28	4,69	9,87%	0,13
6	23769544	GY, NUE					160	30	4,64	9,75%	0,12
6	23779226	GY					159	31	4,08	8,35%	0,20
6	26647522	NHI, HI					175	15	4,28	8,18%	0,08

6	27015435	HI					115	75	4,63	9,34%	0,05
7	4204720	HI					181	9	4,09	8,20%	0,10
7	13166674	HI					169	21	4,11	8,25%	0,10
7	16899054	HI					175	15	4,20	8,23%	0,09
7	20947253	PH					177	13	4,21	5,48%	0,20
7	22426843	NUE					165	25	4,45	9,64%	0,12
7	26680214	PANM2					157	33	4,22	7,67%	0,49
8	1293588	HI					181	9	4,80	9,89%	0,03
8	1515983	HI					181	9	4,80	9,89%	0,03
8	1516003	HI					181	9	4,80	9,89%	0,03
8	1516020	HI					181	9	4,80	9,89%	0,03
8	1517329	HI					181	9	4,80	9,89%	0,03
8	1640047	HI					181	9	4,80	9,89%	0,03
8	18777521	SY					181	9	4,02	8,27%	0,47
9	1504274	GL		LOC_Os09g03140	cytokinin-O-glucosyltransferase 2	<b>1504274</b>	169	21	4,19	8,58%	0,15
9	1504282	GL		LOC_Os09g03140	cytokinin-O-glucosyltransferase 2	<b>1504282</b>	169	21	4,19	8,58%	0,15
9	1824735	NUTE					169	21	4,10	8,45%	0,08
9	16968338	FG	PTC1; TMS 9-1(OsMS1)	Os09g27620	Tapetal cell death, pollen fertility	16787575	173	17	5,53	12,27%	0,11
9	18965171	NHI, HI					182	8	5,31	10,52%	0,03
9	19018354	NUTE					180	10	4,83	9,91%	0,05
9	22155342	SNC					124	66	4,46	9,62%	0,55
10	5805785	PH					177	13	4,86	6,50%	0,10
10	9200444	PH					181	9	4,29	5,59%	0,20
10	9272847	GNC					177	13	4,01	8,49%	0,14
10	10102852	GNC					173	17	4,06	8,61%	0,14
10	10208662	GNC					172	18	4,46	9,62%	0,13
10	10224043	GNC, NUTE					175	15	4,94	10,88%	0,07
10	10229062	GNC, NUTE					175	15	4,94	10,88%	0,07
10	10229142	GNC, NUTE					176	14	4,66	9,50%	0,05
10	10231077	GNC, NUTE					176	14	4,89	10,05%	0,05
10	10257875	GNC					172	18	4,49	9,71%	0,15
10	10271091	GNC, NUTE					176	14	4,89	10,05%	0,05
10	10271097	GNC, NUTE					176	14	4,89	10,05%	0,05
10	10278092	GNC, NUTE					175	15	4,94	10,88%	0,07
10	10278094	GNC, NUTE					175	15	4,94	10,88%	0,07
10	10278095	GNC, NUTE					175	15	4,94	10,88%	0,07
10	10278099	GNC, NUTE					175	15	4,94	10,88%	0,07



10	10302827	GNC, NUTE					176	14	4,66	9,50%	0,05
10	18149430	TGW					162	28	4,19	8,80%	0,29
10	19249891	HI					111	79	4,70	9,18%	0,07
11	4346135	SY					135	55	4,02	8,26%	0,47
11	4346881	SY					140	50	4,53	9,54%	0,47
11	4787782	FG					178	12	4,15	7,18%	0,54
11	5345785	NHI, HI					169	21	4,49	8,37%	0,14
11	5345811	NHI, HI					167	23	4,28	7,92%	0,14
11	5345812	NHI, HI					167	23	4,28	7,92%	0,14
11	5348456	NHI, HI					168	22	4,19	7,72%	0,15
11	5348486	NHI, HI					168	22	4,19	7,72%	0,15
11	17914157	TGW					136	54	4,07	8,01%	0,19
11	18075204	TGW	like GW5	Os11g31060	IQ calmodulin-binding and BAG domain containing protein	18070582	148	42	4,08	8,52%	0,35
11	18076335	TGW					151	39	4,52	9,19%	0,18
11	18094985	TGW					130	60	4,90	10,12%	0,12
11	18095189	TGW					132	58	4,86	10,02%	0,12
11	18101914	TGW		Os11g31100	gibberellin response modulator protein	<b>18101914</b>	135	55	4,16	8,32%	0,19
11	18101916	TGW					135	55	4,16	8,32%	0,19
11	18102272	TGW					136	54	4,92	10,19%	0,12
11	19200467	GY, NUE, NUTE, NHI, HI	<i>tld1-D</i>	<i>Os11g32510</i>	Tillering dwarf, Leaf angel. Drought toler. Auxin catabolism	<i>19184702</i>	180	10	5,53	11,62%	0,03
11	19365597	NUTE, NHI, HI		<i>Os11g32770</i>	ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor	<i>19358597</i>	181	9	4,72	8,68%	0,13
11	19582033	NUTE					150	40	4,09	8,13%	0,14
11	20004072	NUTE, HI					181	9	4,67	9,41%	0,09
11	21164565	NUTE, HI					180	10	4,14	8,55%	0,08
11	22302305	GNC					166	24	4,21	9,02%	0,13
11	22302701	GNC, NUTE					163	27	4,68	10,23%	0,13
11	24219348	NHI, HI					125	65	4,32	7,75%	0,17
11	24219351	NHI, HI					125	65	4,32	7,75%	0,17
11	25423482	GNC					139	51	4,08	8,64%	0,16
11	25423484	GNC					139	51	4,08	8,64%	0,16
11	28009892	GNC					166	24	4,39	9,45%	0,13
12	6748428	GW					176	14	4,85	8,90%	0,06
12	6799950	GW					176	14	4,85	8,90%	0,06
12	6859121	GW					175	15	4,77	8,74%	0,06
12	6894314	GW					175	15	4,77	8,74%	0,06
12	6895796	GW					174	16	4,44	8,02%	0,11

12	9124910	GT					162	28	4,12	7,68%	0,54
12	9914173	NHI	rbcS; OsRBCS2	Os12g17600	Rubisco content, Photosynthetic capacity,	10080820	126	64	4,46	8,30%	0,14
12	10531085	NHI					126	64	4,84	9,16%	0,13
12	15324839	GL					178	12	4,61	9,62%	0,11
12	15324840	GL					178	12	4,61	9,62%	0,11
12	17563026	SPIPAN					177	13	4,46	9,70%	0,47
12	22174777	TGW					161	29	4,37	9,20%	0,20
12	22372837	TGW					163	27	4,45	9,41%	0,20
12	22448245	TGW					162	28	5,00	10,43%	0,12
12	23472946	TGW					174	16	4,08	7,62%	0,19
12	23491971	TGW					171	19	4,57	8,26%	0,19
12	23524310	TGW					170	20	4,28	7,68%	0,19
12	23524313	TGW					170	20	4,28	7,68%	0,19
12	25025178	GNC					181	9	4,24	9,05%	0,24

\* LOD : logarithm of odds, valeur égale à  $-\log_{10}$  (p-value)

\*\* R<sup>2</sup> max : pourcentage de variance maximal expliqué par les marqueurs

\*\*\* q min : valeur de p-value ajusté, calculée pour contrôler le taux de faux positif (FDR)

Dans le deuxième haplotype du chromosome 6 (21460579-27015435), un gène candidat d35 (Os06g37300; Itoh et *al.*, 2004) peut être signalé car il correspond à une enzyme de biosynthèse de la gibbérelline, dont la déficience induit une taille semi-naine. Ce gène est situé à 7 kb du SNP Chr6\_22028211 associé à l'azote total absorbé par la plante. Dans le troisième haplotype sur le chromosome 11 (19200467-22302701), tld1-D, un gène impliqué dans la synthèse de l'auxine dont la mutation induit une augmentation du nombre de talles et le nanisme, (Os11g32510, Zhang et *al.*, 2009) est situé à 16 kb du SNP chr11\_19200467 associé à GY<sup>143</sup>, NUE, NUTE<sup>144</sup>, NHI et HI. Encore dans ce même haplotype, il y a Os11g32770, un gène candidat déjà discuté ci-dessus pour son rôle présumé dans la remobilisation de l'azote, situé à 7 kb de SNP chr11\_19365597 et associé à NUTE, NHI et HI.

#### III.4. Conclusion partielle de la partie III

L'objectif de cette étude est d'identifier, par l'étude d'association, les régions génomiques associées à la variation de NUE, de ses composantes et d'autres caractères agronomiques qui lui sont liés. Les résultats ont identifié au total 306 marqueurs significatifs pour les 21 caractères agronomiques mesurés dont deux associations, au minimum, ont été identifiées pour chaque caractère. Le nombre maximum d'associations marqueurs-caractères observées est de 57 pour le nombre de panicules par mètre carré. Pour NUE et ses composantes, 4, 5 et 28 SNPs sont associés, respectivement à NUE, NUPE et NUTE. Les marqueurs, qui sont en fort déséquilibre de liaison, sont groupés en 47 régions haplotypiques dont trois sont intéressants car ils ont des effets pléiotropiques sur plusieurs caractères.

#### IV. Conclusion partielle du chapitre III

Pour conclure, le chapitre III vise à étudier le déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote afin d'identifier les locus impliqués dans sa variation. Pour ce faire, il s'agit d'évaluer, en premier lieu, dans la partie II, les caractéristiques phénotypiques de NUE, de ses composantes (NUPE, NUTE) et d'autres caractères, et en deuxième lieu, d'identifier, dans la partie III, les régions chromosomiques responsables de la variation de NUE et d'autres caractères agronomiques qui lui sont liés, à l'aide de la génétique d'association.

Le résultat de l'analyse de variance du panel de 198 variétés de riz pluvial a confirmé l'existence de la variabilité génotypique pour NUE et de ses composantes déjà décrite dans Rakotoson et *al.* (2017), ce qui implique l'existence d'une potentialité génétique pour l'amélioration de ces caractères. L'analyse de la relation entre NUE et ses composantes a montré que NUPE contribue à plus de 60% de la variation de NUE, quel que soit le niveau d'azote et plus l'azote du milieu est limité, plus cette contribution apparaît importante. Il existe aussi une corrélation positive significative entre NUE et NUPE et entre NUE et NUTE.

---

<sup>143</sup> Rendement en grains

<sup>144</sup> Efficacité de conversion de l'azote

A faible niveau d'azote, la corrélation entre NUE et NUPE devient très forte alors qu'à fort niveau d'azote, la valeur du coefficient de corrélation entre NUE et NUPE et NUE et NUTE devient presque la même.

Cette étude a aussi montré la potentialité de GWAS à identifier des gènes candidats et de nouveaux locus associés aux caractères agronomiques d'intérêt. Nous avons détecté 306 SNPs (à  $p < 10^{-4}$ ) pour les 21 caractères agronomiques mesurés. Parmi les 36 SNPs associés à NUE et ses composantes (NUPE, NUTE), 29 SNPs colocalisent avec plusieurs caractères comme l'indice de récolte, l'indice de récolte azoté, la teneur en azote des grains, le pourcentage de grains pleins, l'azote total absorbé par la plante et la date de floraison. Le regroupement de ces SNPs significatifs qui sont en fort déséquilibre de liaison en régions haplotypiques permet d'identifier trois régions chromosomiques intéressantes car elles sont associées à plusieurs caractères. En plus, deux de ces trois haplotypes sont associés au rendement en grains et à NUE. Ces régions génomiques nécessitent une étude approfondie.

## DISCUSSION GENERALE

## DISCUSSION GENERALE

### ➔ Variabilité génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote

Pour mieux orienter les programmes de sélection dans l'amélioration et la compréhension d'un caractère, l'évaluation de la variabilité génétique de ce caractère est une étape importante. Dans cette étude, nous nous intéressons principalement au caractère « efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) ». Comme il s'agit d'un caractère quantitatif complexe, il a été divisé en deux composantes, l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) et l'efficacité d'utilisation ou de conversion de l'azote (NUTE). De plus, un grand nombre de traits associés à ces mesures d'efficacité ont été mesurés (composantes du rendement, teneurs en azote dans différents compartiments de la plante et à différents stades ...). L'ensemble des caractères a été évalué (i) sur une série de 13 variétés de riz pluvial lors d'un essai préliminaire pendant trois campagnes (2012 à 2015) puis (ii) sur un panel à large diversité de 198 variétés de riz pluvial lors d'un essai pendant deux campagnes (2014-2016) dans le Moyen Ouest de Madagascar. Les résultats de l'analyse de variance ont montré qu'il existe une variabilité génétique significative pour NUE, NUPE, NUTE, ainsi que pour les autres caractères agronomiques mesurés lors de ces deux expérimentations. Cela vient confirmer l'existence d'une variabilité génétique de NUE sur le riz déjà mise en évidence par de nombreux auteurs (Broadbent *et al.*, 1987; De Datta and Broadbent, 1988, 1993; Tirol-Padre *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998; Inthapanya *et al.*, 2000; Koutroubas and Ntanos, 2003 ; Wu *et al.*, 2016 ; Rakotoson *et al.*, 2017). Cette variabilité permet donc d'envisager l'amélioration de ce caractère chez le riz pluvial. Pourtant, l'azote disponible dans le sol a été différent d'une campagne à l'autre principalement à cause des conditions climatiques, en l'occurrence la pluviométrie, très variable d'une année à l'autre. En effet, les interactions des facteurs « génotype » et « niveau d'azote » avec le facteur « année » ont été significatives, nous obligeant à analyser les données année par année. Cette situation a aussi rendu difficile les comparaisons des variétés entre elles d'une année à l'autre. Par exemple, dans l'essai préliminaire, la variété SCRID195 présentant le meilleur rendement en grains (GY) en 2013 devient celle qui a le plus faible GY en 2015. Nous n'avons pas identifié de variétés qui présentent systématiquement le meilleur GY lors des trois années. Néanmoins, la variété WAB880 a présenté le meilleur GY deux années sur trois (2014 et 2015). Pour NUE, le même constat a été fait. Deux variétés se distinguent, pour leur complémentarité pour les composantes de NUE (NUPE et NUTE). Il s'agit de la variété 126C409, qui présente le meilleur NUTE et la variété WAB880 déjà citée ci-dessus qui a le meilleur NUPE des treize variétés étudiées. Le croisement de ces variétés pourrait donc permettre d'obtenir des descendants transgressifs pour le NUE puisque nous avons aussi montré que NUPE et NUTE sont largement indépendants l'un de l'autre.

Dans cette étude, les résultats ont aussi montré des valeurs modestes de l'héritabilité pour NUE ( $H^2$  de 0,48 en LN et de 0,58 en HN lors de l'essai préliminaire ; et  $H^2$  de 0,53 en LN et de 0,69 en HN lors de

l'essai avec le panel). Parmi les composantes de NUE, NUTE est plus fortement héritable que NUPE. Ceci montre que les facteurs environnementaux influent beaucoup sur ces caractères. La valeur de cette héritabilité est aussi importante pour les analyses d'associations car elle représente la part de la variance expliquée par les facteurs génétiques pour un caractère et si elle est faible, moins d'associations seront détectées pour ce caractère.

#### → Contribution de ses composantes à l'efficacité de l'utilisation de l'azote

L'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) a été décomposée en deux, l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) et l'efficacité de l'utilisation ou de conversion de l'azote (NUTE), une analyse de contribution de ces deux composantes a été effectuée, afin d'identifier celle qui est importante pour mieux comprendre et améliorer le NUE chez le riz pluvial. Dans l'essai préliminaire, la variation de NUPE contribue fortement (69% à 83%) à la variation de NUE sauf en 2013-HN. Lors de l'essai avec le panel de 198 variétés, cette forte contribution de NUPE a été confirmée. NUPE contribue plus à la variation de NUE que NUTE, quel que soit le niveau d'azote ou l'année (68% à 80%). L'efficacité de l'absorption de l'azote est très importante, surtout à faible niveau d'azote (LN). Chez le blé, Le Gouis *et al.* (2000) et Gaju *et al.* (2011) ont aussi observé que NUPE contribue plus à la variation de NUE à faible niveau d'azote, par contre, à fort niveau d'azote, NUTE devient prépondérant. L'amélioration de l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) apparaît donc comme la composante la plus importante pour améliorer le NUE chez le riz pluvial en particulier à faible niveau d'azote, et ceci implique d'étudier les caractéristiques racinaires du riz pluvial. Ju *et al.* (2015) ont trouvé qu'à faible niveau d'azote, un meilleur rendement en grains et un meilleur NUE est associé à un enracinement profond. Et généralement, le système racinaire des *japonicas* est plus profond que celui des *indica* (Lafitte *et al.*, 2001). La caractérisation des systèmes racinaires des variétés de riz pluvial utilisées dans le Moyen Ouest en relation avec le NUE est donc préconisée.

#### → Caractères agronomiques corrélés avec l'efficacité de l'utilisation de l'azote

Compte tenu de la grande différence entre les trois campagnes lors de l'essai préliminaire (2012 à 2015), il a été difficile de mettre en évidence des corrélations stables entre NUE et les autres caractères agronomiques mesurés. Il y a en effet une grande plasticité des relations entre NUE et les autres caractères mesurés en fonctions des conditions de l'année. Toutefois, en plus du rendement en grains qui est très corrélé au NUE, l'azote total absorbé par la plante et l'efficacité de l'absorption de l'azote sont systématiquement corrélés significativement et positivement avec NUE quel que soit l'année et le niveau d'azote. Par ailleurs deux caractères, le nombre de panicules par mètre carré et l'indice de récolte, sont corrélés significativement et positivement avec NUE deux années sur trois (Figure 14). Ces deux caractères sont des composantes du rendement en grains. Lors de l'essai avec le panel de 198 variétés, la forte corrélation de NUE avec NUPE,

GY et TNUP quel que soit l'année et le niveau d'azote, a été confirmée. La forte corrélation positive entre NUE et HI a aussi été confirmée (Tableau 14). En revanche, la corrélation entre NUE et le nombre de panicules par mètre carré même si elle est significative apparaît beaucoup moins forte dans le cas du panel de diversité large. Deux autres composantes du rendement apparaissent corrélées significativement avec NUE dans l'essai panel de diversité large. Il s'agit du nombre d'épillets par panicule et du pourcentage de grains pleins. Ces caractères, facilement mesurables sur le terrain et plus héréditaires que NUE ou le rendement en grains, peuvent permettre d'identifier les variétés avec une meilleure NUE et un meilleur rendement en grains.

➔ Complexité du déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote

Les analyses d'association du panel de 198 variétés ont été effectuées par année et par niveau d'azote avec les données phénotypiques de 21 caractères et avec les données génotypiques de chaque variété pour 38390 marqueurs SNP et 190 variétés. Elles ont révélé 306 associations marqueurs-caractères significatives à un seuil de  $p=10^{-4}$ . Pour chacun des caractères mesurés, au moins deux associations marqueurs-caractères ont été identifiées. Les marqueurs significatifs identifiés spécifiquement pour chaque niveau d'azote (LN pour faible niveau et HN pour fort niveau) sont moins nombreux que ceux qui sont détectés simultanément en LN et HN, ce qui veut dire que nous ne pouvons pas encore identifier de marqueurs spécifiques pour l'adaptation au faible niveau d'azote pour NUE ou pour les autres caractères agronomiques mesurés.

Pour les études d'associations pangénomiques, le déséquilibre de liaison, qui décrit la liaison statistique entre allèles à deux locus, permet d'estimer le niveau de résolution avec lequel les différentes associations détectées sont cartographiées. Le déséquilibre de liaison observé dans cette étude est très fort et s'éteint progressivement en dessous de la valeur de  $r^2$  de 0,2 au-delà de 1000 kb. Cette valeur du DL est supérieure par rapport à celle du panel de référence de *japonica* mondial. Le déséquilibre de liaison du riz est variable selon les groupes génétiques (Mather et al., 2007) et Seguin et al. (2006) ont confirmé que chez le groupe de riz *japonica*, le déséquilibre de liaison a tendance à être plus élevé. Compte tenu de ce DL élevé, la résolution de la cartographie de QTL dans notre étude est faible et rend difficile l'identification non ambiguë de gènes causatifs des polymorphismes observés. En revanche, le nombre de marqueurs disponibles pour l'étude permet une couverture complète du génome. Toutefois, les signaux d'association détectés dans notre analyse semblent pertinents. Ainsi, nous avons obtenus des signaux forts à proximité de gènes déjà connus et impliqués dans la variation de quatre caractères modèles simples descripteurs du grain (présentés dans les figures 30, 31, 32, 33 et relatifs à l'aristation, la pilosité, la longueur et la largeur du grain, respectivement).

Pour NUE, quatre marqueurs significatifs ont été identifiés dont deux (sur le chromosome 6) et un (sur le chromosome 11) sont aussi associés au rendement en grains, signifiant que les gènes contrôlant le



GY et le NUE sont les mêmes, ce qui est cohérent puisque que NUE et GY sont fortement corrélés phénotypiquement (Figure 21). Le marqueur significatif identifié sur le chromosome 11 se trouve à 16 kb seulement du gène Os11g32510 identifié par Zhang et *al.* (2009). En plus, ce marqueur (Chr11\_19200467) est pleiotropique et est associé aussi à l'indice de récolte (HI). Ce qui signifie que les gènes contrôlant le HI est aussi impliqué dans NUE. Ceci a été confirmé aussi par les données phénotypiques, qui ont montré une corrélation positive et élevée entre NUE et HI (Figure 14, Tableau 14), en effet l'amélioration de HI implique une amélioration de NUE, vu qu'ils sont, en partie, sous le contrôle d'un même gène.

## ➔ Recommandations

Le fait de décomposer le NUE en NUPE et NUTE a permis d'identifier deux meilleures variétés complémentaires pour ces deux composantes. La variété 126C409 a été meilleure pour NUTE et la variété WAB880, meilleure pour NUPE. Le croisement de ces deux variétés pourrait aboutir à des lignées recombinantes présentant les deux caractéristiques recherchées (NUPE et NUTE élevés) et donc un NUE amélioré.

Compte tenu de la variabilité des conditions climatiques entre saisons et au sein d'une même saison en particulier en lien avec la pluviométrie, il serait utile d'avoir une bonne mesure de la quantité d'azote, tant au début du cycle qu'à chaque phase de développement du riz (tallage, montaison, floraison, remplissage) afin de bien connaître l'azote disponible dans le sol pour la plante. Seuls des modèles de bilan azoté peuvent permettre de fournir ces informations sous forme dynamique.

Ceci permet de connaître l'efficacité de translocation et l'efficacité de remobilisation de l'azote. Une absorption post-floraison de l'azote a été trouvée importante lors de l'essai préliminaire, une meilleure suivie de la quantité d'azote absorbé par la plante entre la floraison et la récolte permettra de clarifier l'importance de cette absorption pour le rendement en grains et aussi pour le NUE.

La région génomique identifiée sur le chromosome 11 (19200467-22302701) est associée à plusieurs caractères tels que le rendement en grains (GY), l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUTE), l'indice de récolte azoté (NHI), l'indice de récolte (HI), la teneur en azote des grains (GNC) et l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE). Il est donc recommandé de faire une analyse plus poussée sur cette région du génome car la plupart des marqueurs significatifs dans cette région sont associées à NUTE, une des composantes de NUE.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le fil conducteur et l'objectif de ce travail de thèse a été de contribuer à une meilleure compréhension du déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) chez le riz pluvial. En préalable, une étude fine de la variabilité génétique du NUE a été réalisée sur un échantillon de treize variétés à deux niveaux contrastés de fertilisation azotée. Pour cela, le NUE qui est un caractère complexe a été décomposé en deux composantes: l'efficacité d'absorption de l'azote (NUPE) et l'efficacité de conversion ou d'utilisation de l'azote (NUTE). Les relations du NUE, de ses composantes et d'autres caractères liés à l'azote (comme l'azote absorbé par la plante, la teneur en azote des grains et pailles, l'indice de récolte pour l'azote, l'absorption d'azote post-floraison, l'azote absorbé à floraison, la teneur en azote à floraison) avec d'autres caractères agronomiques (comme le rendement et ses composantes, la date de floraison, la biomasse à floraison, l'indice de récolte, le LAI) ont été étudiées. Pour étudier le déterminisme génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote, une étude d'association pangénomique a été menée sous deux niveaux d'azote (faible niveau d'azote LN et fort niveau d'azote HN) sur un panel de 198 variétés de riz essentiellement de type japonica, provenant de différents programmes de sélection mais sélectionnées pour leur adaptation aux conditions de culture pluviale à Madagascar. Les mêmes caractères étudiés dans l'essai préliminaire ont été mesurés sur ce panel sauf les mesures à floraison et les mesures de LAI. Le caractère complexe du NUE et de ses interactions avec les conditions environnementales a été confirmé.

La première hypothèse que nous avons posée, stipulant qu'il existait une variabilité génétique pour l'efficacité de l'utilisation de l'azote, pour ses composantes et pour tous les autres caractères agronomiques mesurés a été vérifiée. Cette variabilité génétique peut être mobilisée dans les travaux d'amélioration génétique. La variation du NUPE contribue plus fortement à la variation du NUE que le NUTE. Ce point apparaît particulièrement vrai dans les conditions de faible niveau d'azote. Il n'y a pas de corrélation négative ou positive entre NUTE et NUPE quel que soit le niveau d'azote, ce qui permet d'envisager l'amélioration de chacune des composantes indépendamment (à noter que dans le panel GWAS, cette corrélation est significative même si elle est très faible). Nous n'avons pas observé de corrélations négatives entre le rendement en grain et la teneur en azote des grains dans les conditions de faible niveau d'azote (même constatation dans le panel GWAS), NUE est positivement et fortement corrélé avec le nombre de panicules par mètre carré et l'indice de récolte quelles que soient les conditions (année/azote). La différence entre l'azote total absorbé à la récolte et l'azote absorbé à floraison est positivement corrélée avec le NUE en particulier à faible niveau d'azote.

Après la floraison, le remplissage du grain dépend de deux sources d'azote qui sont l'azote remobilisé à partir des organes végétatifs et l'azote nouvellement absorbé. Nous avons tenté de mesurer l'azote absorbé post floraison par la mesure de la différence entre l'azote absorbé à maturité (TNUP) et

l'azote absorbé à floraison (FLNUP). Des valeurs négatives ont été observées (en 2013 HN, 2015 HN et 2015 LN) qui suggèrent des pertes en azote entre floraison et maturité alors que dans le même intervalle, la biomasse continue d'augmenter (de +27% à +44%). Ces pertes pourraient être des pertes d'azote gazeux (Xue et al., 2012; Kumagai et al., 2011), Ces observations mériteraient d'être confirmées dans des expérimentations complémentaires compte tenu de la faible héritabilité observée pour TNUP et FLNUP lors de nos essais. Les implications de ces observations sont importantes car elles suggèrent qu'il pourrait y avoir un levier d'amélioration de l'efficacité du NUE en limitant ces pertes d'azote gazeux, Par ailleurs, si l'importance de ces pertes est confirmée, elles compliqueraient l'évaluation de l'absorption d'azote post-floraison qui peut aussi être un autre levier d'amélioration du NUE particulièrement à faible niveau d'azote.

Le caractère stay-green (la capacité d'une variété à retarder son entrée en sénescence et donc à maintenir une capacité photosynthétique pendant le remplissage des grains) et sa relation avec NUE doit être étudiée plus précisément chez le riz pluvial en particulier dans les conditions de faible azote, Maintenir la plante de riz active sur le plan photosynthétique est antagoniste de la remobilisation de l'azote liée à la sénescence des feuilles, Toutefois comme l'ont suggéré Wu et al, (2016), il est possible de dissocier la teneur en N des pailles en teneur en N des tiges et teneur en N des feuilles, De cette manière, il est possible de mettre en évidence des relations entre chacun de ces compartiments avec NUTE, Ils ont ainsi proposé, pour améliorer NUTE, d'augmenter les translocations spécifiquement depuis les tiges plutôt que des feuilles, de façon à retarder la sénescence.

La deuxième hypothèse qui stipule que les zones du génome responsables de la variation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote peuvent être étudiées à travers la génétique d'association a aussi été vérifiée car nous avons identifié, tant pour NUE que pour tous les autres caractères, des associations significatives. Le déséquilibre de liaison a été assez fort dans le panel des 190 variétés étudiées. Sa valeur tombe à  $r^2=0,2$  pour une distance entre marqueurs dépassant 1 megabase tandis que dans le panel de référence japonica mondial, ça a été seulement à partir de 400 kilobases. Avec 38390 marqueurs SNP, la distance moyenne entre marqueurs adjacents est de 11 kb. Cette densité de marquage est donc suffisante pour envisager dans de bonnes conditions la détection d'associations entre marqueurs et caractères sur l'ensemble du génome du riz. Le dispositif expérimental mis en place dans notre étude était valide. Il a été, en effet, possible d'identifier des signaux d'association forts avec des caractères morphologiques du grain à proximité de gènes connus impliqués dans leur contrôle: la largeur du grain (marqueur le plus significatif à 26 kb de GW5), la longueur du grain (marqueur le plus significatif à 94 kb de GS3), l'aristation du grain (marqueur le plus significatif à 733 kb de Awn 1) et la pilosité du grain (marqueur le plus significatif à 83 kb de Glabrous 1). Notre dispositif permet d'identifier des associations marqueurs-caractères pertinentes

mais avec une précision variable et relativement faible qui ne permet pas l'identification des gènes causatifs avec sécurité.

Les résultats directs sur le déterminisme génétique des caractères complexes que sont le NUE ou le rendement en grains sont très faibles (3 QTLs et 1 QTL respectivement). En revanche, un grand nombre d'association marqueurs-caractères et de QTLs ont été identifiés avec l'ensemble des autres caractères étudiés et notamment pour leurs composantes. Toutefois l'identification des gènes causatifs de ces associations reste un exercice périlleux compte tenu du niveau de résolution que l'on a obtenu dans cette étude. Un certain nombre de pistes concernant des gènes candidats ont toutefois été proposées.

Au total, pour l'ensemble des 21 caractères mesurés, 306 associations marqueurs-caractères ont été identifiées au seuil  $p=10^{-4}$ , 68% de ces associations ont été identifiées à la fois à fort et à faible niveau d'azote. Les marqueurs impliqués dans ces associations et qui sont en fort déséquilibre de liaison ont été regroupés en 47 régions haplotypiques. Très peu d'associations significatives ont été détectées pour les caractères complexes comme l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) ou comme le rendement en grains mais beaucoup plus pour l'ensemble de leurs composantes ce qui confirme l'intérêt de décomposer les caractères complexes en des caractères plus simples et plus héréditaires. Trois haplotypes sont particulièrement intéressants car ils ont des effets pléiotropiques sur un grand nombre de caractères, Deux sur trois sont associés au NUE et au rendement en grains. Deux sont associés au NUTE et un au NUPE. A noter que aucun des haplotypes identifiés pour NUTE n'est commun avec les haplotypes identifiés pour NUPE ce qui confirme que le contrôle génétique des deux composantes du NUE est relativement indépendant. Un certain nombre de gènes candidats proche de signaux d'association détectés ont été proposés comme pouvant être impliqué dans la variation des caractères étudiés. Toutefois ces indications restent très spéculatives compte tenu du niveau de résolution dans notre étude.

Les données phénotypiques et génotypiques produites pour l'étude GWAS réalisée au cours de cette thèse sur une population de variétés de riz pluvial utilisées dans le programme de sélection conduit à Madagascar pourraient être exploitées pour calibrer des modèles de sélection génomique, La sélection génomique permet en effet de prendre en compte l'ensemble de l'information génotypique produite sur tout le génome et non seulement l'information liée à certains QTLs/locus (Meuwissen et al., 2001), L'objectif de la sélection génomique est de prédire la valeur génétique des individus à sélectionner pour lesquels on disposerait de données génotypiques permettant d'accélérer le progrès génétique, Spindel et al., (2016) ont même proposé d'inclure les résultats de l'analyse GWAS dans les modèles de prédiction de sélection génomique pour en améliorer la performance.

Une analyse plus fine de la diversité haplotypique serait intéressante à réaliser en particulier dans les zones génomiques correspondant aux différents haplotypes identifiés et notamment les trois haplotypes qui

ont un effet pleiotropique, Cette analyse pourrait permettre de mieux expliquer la variation phénotypique des caractères étudiés car l'utilisation d'haplotypes construits par la combinaison de plusieurs SNP permet d'augmenter le niveau de diversité allélique qui est limité à deux dans le cas des SNP, Cette analyse permet aussi d'identifier des groupes de génotypes intéressants à prendre en compte dans la mise en œuvre d'un programme de sélection pour une amélioration du NUE.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ahmadi N., Becquer T., Larroque C. and Arnaud M., 1988. Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar. *L'agronomie tropicale*, 43: 209-221.
2. Alvarez S., Rufino M.C., Vayssières J., Salgado P., Tiftonell P., Tillard E. and Bocquier F., 2014. Whole-farm nitrogen cycling and intensification of crop-livestock systems in the highlands of Madagascar: An application of network analysis. *Agricultural Systems*, 126: 25-37.
3. Angeles-Shim R.B., Asano K., Takashi T., Shim J., Kuroha T., Ayano M. and Ashikari M., 2012. A wuschel-related homeobox 3B gene, depilous (dep), confers glabrousness of rice leaves and glumes. *Rice*, 5(1): 28.
4. Araki R. and Hasegawa H., 2006. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breeding Science*, 56: 295–302.
5. Atlin G.N. and Frey K.J., 1989. Breeding crop varieties for low-input agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 4: 53–58.
6. BAD (Banque Africaine de Développement). 2016. Revue sur l'efficacité du développement. Rapport du groupe de la Banque africaine de développement. 60 p.
7. Balasubramanian V., Sie M., Hijmans R.J. and Otsuka K., 2007. Increasing rice production in sub-Saharan Africa: challenges and opportunities. *Advances in Agronomy*, 94: 55-133.
8. Baligar V.C., Fageria N.K. and He Z.L., 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32 (7): 921-950.
9. Barraclough P.B., Howarth J.R., Jones J., Lopez-Bellido R., Parmar S., Shepherd C.E and Hawkesford M.J., 2010. Nitrogen efficiency of wheat: genotypic and environmental variation and prospects for improvement. *European Journal of Agronomy*, 33: 1-11.
10. Bergelson J. and Roux F., 2010. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 11(12): 867-879.
11. Bertin P. and Gallais A., 2000. Genetic variation for nitrogen use efficiency in a set of recombined maize inbred lines. I. Agrophysiological results. *Maydica*, 45: 53-66.
12. Bettembourg M., Dardou A., Audebert A., Thomas E., Frouin J., Guiderdoni E., Ahmadi N., Perin C., Dievart A. and Courtois B., 2017. Genome-wide association mapping for root cone angle in rice. *Rice*, 10 (1): 45.
13. Bingham I., Karley A., White P.J. and Russell J.R., 2012. Analysis of improvements in nitrogen use efficiency associated with 75 years of barley breeding. *European Journal of Agronomy*, 42: 49-58.
14. Biscarini F., Cozzi P., Casella L., Riccardi P., Vattari A., Orasen G., Perrini R., Tacconi G., Tondelli A., Biselli C., Cattivelli L., Spindel J., McCouch S., Abbruscato P., Valé G., Piffanelli P. and Greco R., 2016. Genome-wide association study for traits related to plant and grain morphology, and root architecture in temperate rice accessions. *PloS one*, 11: 5.
15. Bogard M., Allard V., Brancourt-Hulmel M., Heumez E., Machet J.M., Jeuffroy M.H., Gate P., Martre P. and Le Gouis J., 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61: 4303-4312.
16. Borba T.C.O., Brondani R.P.V., Breseghello F., Coelho A.S.G., Mendonça J.A., Rangel P.H.N.R. and Brondani C., 2010. Association mapping for yield and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 33 (3): 515-524.
17. Bordes J., Branlard G., Oury F.X., Charmet G. and Balfourier F., 2008. Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection. *Journal of Cereal Sciences*, 48: 569-579.
18. Borrell A.K. and Hammer G.L., 2000. Nitrogen dynamics and the physiological basis of staygreen in sorghum. *Crop Science*, 40: 1295-1307.
19. Bouldin D.R., Klausner S.D. and Reid W.S., 1984. Use of nitrogen from manure. In: Hauck, R.D. (Ed.), *Nitrogen in Crop Production*. ASA-CSSA-SSSA, 221-245.



20. Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E, Casstevens T.M., Ramdoss Y. and Buckler E.S., 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23: 2633-2635.
21. Breumier P., Ramarosandratana A., Ramanantsoanirina A., Vom-Brocke K., Marquié C., Dabat M-H. et Raboin L.M., 2018. Évaluation participative des impacts de la recherche sur le riz pluvial d'altitude à Madagascar de 1980 à 2015. *Cahier d'Agriculture*, 27: 15004.
22. Broadbent F. E., De Datta S. K. and Laureles E.V., 1987. Measurement of nitrogen utilization efficiency in rice genotypes. *Agronomy Journal*, 79: 786-791.
23. Browning S.R. and Browning B.L., 2007. Rapid and accurate haplotype phasing and missing data inference for whole genome association studies by use of localized haplotype clustering. *American Journal of Human Genetics*, 81: 1084-1089.
24. Cai C., Wang J.Y., Zhu Y.G., Shen Q.R., Li B., Tong Y.P. and Li Z.S., 2008. Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *Journal Integrative of Plant Biology*, 50: 443-451.
25. Cardinale B.J., Duffy J. E., Gonzalez A., Hooper D.U. and Perrings C., 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486 (7401): 59.
26. Cassman K.G., Dobermann A., Sta-Cruz P.C., Gines C., Samson M.I., Descalsota J.P., Alcantara J.M., Dizon M. and Olk D.C., 1996. Soil organic matter and the indigenous nitrogen supply of intensive irrigated rice systems in the tropics. *Plant Soil*, 182: 67-78.
27. Ceccarelli S., 1996. Adaptation to low/high input cultivation. *Euphytica*, 92: 203-214.
28. Chen J., Zhang Y., Tan Y., Zhang M., Zhu L., Xu G. and Fan X., 2016. Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving OsNRT2.1 expression with the OsNAR2.1 promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 14: 1705-1715.
29. Chen X.C., Zhang J., Chen Y.L., Li Q., Chen F.J., Yuan L.X. and Mi G.H., 2013. Changes in root size and distribution in relation to nitrogen accumulation during maize breeding in China. *Plant and Soil*, 374: 121–130.
30. Cho Y., Jiang W.Z., Chin J.H., Piao Z.P., Cho Y.G., McCouch S.R. and Koh H.J., 2007. Identified QTLs associated with physiological nitrogen use efficiency in rice. *Molecules and Cells*, 23: 72-79.
31. Coque M., Martin A., Veyrierias JB, Hirel B and Gallais A., 2008. Genetic variation of N-remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. III. QTL detection and coincidences. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 729-747.
32. Cormier F., Faure S., Dubreuil P., Heumez E., Beauchêne K., Lafarge S., Praud S. and Le Gouis J. 2013. A multi-environmental study of recent breeding progress on nitrogen use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 14p.
33. Courtois B., Audebert A., Dardou A., Roques S., Ghneim-Herrera T., Droc G., Frouin J., Rouan L., Gozé E., Kilian A., Ahmadi N. and Dingkuhn M., 2013. Genome-wide association mapping of root traits in a *japonica* rice panel. *PLoS ONE*, 8: 11.
34. Dai G.J, Cheng S.H., Hua Z.T., Zhang M.L., Jiang H.B., Feng Y., Shen X.H., Su Y.A., He N., Ma Z.B., Ma Q.X., Hou S.G. and Wang Y.R., 2015. Mapping quantitative trait loci for nitrogen uptake and utilization efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) at different nitrogen. *Genetics and Molecular Research*, 14 (3): 10404-10414.
35. David-Benz H., Rasolofo P. and Andriamparany S., 2010. Observatoire et plateforme de concertation: deux outils complémentaires d'aide à la decision pour la filière riz à Madagascar. OPDE 2010. Aide à la décision et gouvernance, Oct 2010, Montpellier, France, 16 p.
36. David-Benz H., 2011. A Madagascar: les prix du riz flambent, sans rapport avec le marché international. Rapport du Cirad en collaboration avec l'Observatoire du riz. 4 p.
37. Dawson J.C., Huggins D.R. and Jones S.S., 2008. Characterizing nitrogen use efficiency in natural and agricultural ecosystems to improve the performance of cereal crops in low-input and organic agricultural systems. *Field Crops Research*, 107: 89-101.

38. De Datta S.K. and Broadbent F.E., 1988. Methodology for evaluating nitrogen utilization efficiency by rice genotypes. *Agronomy Journal*, 80: 793-798.
39. De Datta S.K. and Broadbent F.E., 1990. Nitrogen-use efficiency of 24 rice genotypes on an N-deficient soil. *Field Crops Research*, 23: 81–92.
40. De Datta S.K. and Broadbent F.E., 1993. Development changes related to nitrogen–use efficiency in rice. *Field Crops Research*, 34: 47–56.
41. De Dorlodot S., Forster B.P.L., Price A., Tuberosa R. and Draye X., 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*, 12: 474-481.
42. De San M., Citeau C. and Tiambaohaka C., 2017. Training on rice-fish farming in high schools in Madagascar’s highlands. Report/Rapport SF-FAO/2017/39. FAO. SmartFish Programme of the Indian Ocean Commission, Ebène, Mauritius. 34p.
43. Dhugga K.S. and Waines J.G., 1989. Analysis of nitrogen accumulation and use in bread and durum wheat. *Crop Science*, 29: 1232-1239.
44. Dilla-Ermita C.J., Tandayu E., Juanillas V.M., Detras J., Lozada D.N., Dwiyanti M.S., Cruz C.V., Mbanjo E.G.N., Ardales E., Diaz M.G., Mendiolo M., Thomson M. and Kretzschmar T., 2017. Genome-wide association analysis tracks bacterial leaf blight resistance loci in rice diverse germplasm. *Rice*, 10: 8.
45. Dobermann A.R and Fairhurst T.H., 2000. Rice: Nutritional disorders and nutrient management. International Rice Research Institute and Phosphate Institute, Singapore, 191 p.
46. Dobermann A.R., 2005. Nitrogen Use Efficiency – State of the Art. *Agronomy – Faculty Publications*, Paper 316.
47. Domenichini-Ramiaramanana B. and Domenichini J.P., 1983. Madagascar dans l'Océan Indien avant XIIe siècle. Présentation de données suggérant des orientations de recherches. *Les nouvelles du Centre d'Art et d'Archéologie*, 1: 5-19.
48. Domenichini-Ramiaramanana B., 1988. Madagascar dans l'Océan Indien du VII au XIe siècle. In: El Fasi, M. (Ed.), *Histoire générale de l'Afrique, III: L'Afrique du VII au XIe siècle*. Unesco, Paris.
49. Dong H., Zhao H., Xie W., Han Z., Li G., Yao W., Bai X., Hu Y., Guo Z., Lu K., Yang L. and Xing Y., 2016. A novel tiller angle gene, TAC3, together with TAC1 and D2 largely determine the natural variation of tiller angle in rice cultivars. *PLoS Genetics*, 12: 11.
50. Dong H., Zhao H., Li S., Han Z., Hu G., Liu C., Yang G., Wang G., Xie W. and Xing Y., 2018. Genome-wide association studies reveal that members of bHLH subfamily 16 share a conserved function in regulating flag leaf angle in rice (*Oryza sativa*). *PLoS Genet*, 14: 4.
51. Dubois F.T., Gonzalez-Moro M.B., Estavillo J.M., Sangwan R., Gallais A. and Hirel B., 2003. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 : 565-576.
52. Durand E., 2011. Étude des bases (épi) génétiques de l’adaptation dans une expérience de sélection divergente pour la précocité de floraison chez le maïs. *Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI*, 254p.
53. Dusserre J., Raveloson H., Michellon R., Gozé E., Auzoux S. and Sester M. 2017. Conservation agriculture cropping systems reduce blast disease in upland rice by affecting plant nitrogen nutrition. *Field Crops Research*, 204: 208-221.
54. Duvick D.N., 2005. The contribution of breeding (*Zea mays* L.). *Advances in Agronomy*, 86: 83-145.
55. Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S. and Mitchell S.E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6: 5.
56. Fageria N.K., Baligar V.C. and Jones C.A., 1997. *Growth and mineral nutrition of field crops*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
57. Fageria N.K., Morais O.P., Santos A.B., 2010. Nitrogen use efficiency in upland rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 33: 1696-1711.
58. Fan C., Xing Y., Mao H., Lu T., Han B., Xu C., Li X. and Zhang Q., 2006. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(6): 1164-1171.

59. Fan X., Tang Z., Tan Y., Zhang Y., Luo B., Yang M., Lian X., Shen Q., Miller A.J. and Xu G., 2016. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proceedings of National Academy of Science*, 113 (26): 7118-7126.
60. FAO (Food and Agriculture Organization of the UN). 2006. FAO - STAT data base, last accessed on August 15, 2006. FAO, Rome, Italy.
61. FAO (Food and Agriculture Organization of the UN). 2015. FAO/WFP crop and food security assessment mission to Madagascar. Special report. 7 p.
62. Feng Y., Zhai R., Lin z., Cao I.Y., Wei X. and Cheng S., 2015. Quantitative Trait Locus Analysis for Rice Yield Traits under Two Nitrogen Levels. *Rice Science*, 22(3): 108-115.
63. Feng Y., Lu Q., Zhai R., Zhang M., Xu Q., Yang Y., Wang S., Yuan X., Yu H., Wang Y. and Wei X., 2016. Genome-wide association mapping for grain shape traits in indica rice. *Planta*, 244: 819-830.
64. Flint-Garcia S.A., Thornsberry J.M. and Buckler E.S., 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 5: 357-374.
65. Flint-Garcia S.A., ThUILlet A.C., Yu J., Pressoir G., Romero S.M., Mitchell S.E., Doebley J., Kresovich S., Goodman M.M. and Buckler E.S., 2005. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal*, 44: 1054-1064.
66. Forde B.G. and Clarkson D.T., 1999. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research*, 30: 1-90.
67. Forde B.G., 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica Biophysica Acta*, 1465: 219-235.
68. Forde B.G. and Lea P.J., 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2339-2358.
69. Foulkes M.J., Hawkesford M.J., Barraclough P.B., Holdsworth M.J. and Kerr S., 2009. Identifying traits to improve the nitrogen economy of wheat: Recent advances and future prospects. *Field Crops Research*, 114: 329-342.
70. Francis D.D., Schepers J.S. and Vigil M.F., 1993. Post-anthesis nitrogen loss from corn. *Agronomy Journal*, 85: 659-663.
71. Fukai S. and Inthapan P., 1988. Growth and yield of rice cultivars under sprinkler irrigation in south-eastern Queensland: 3. Water extraction and plant water relations- comparison with maize and grain sorghum. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 28: 249-252.
72. Gachomo E.W., Baptiste L.J., Kefela T., Saidel W.M. and Kotchoni S.O., 2014. The *Arabidopsis* CURVY1 (CVY1) gene encoding a novel receptor-like protein kinase regulates cell morphogenesis, flowering time and seed production. *BMC Plant Biology*, 14: 221.
73. Gaju O., Allard V., Martre P., Snape J.W., Heumez E., Le Gouis J., Moreau D., Bogard M., Griffiths S., Orford S., Hubbart S. and Foulkes M.J., 2011. Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research*, 123: 139-152.
74. Gallais A. and Hirel B., 2004. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany*, 55: 295-306.
75. Gallais A. and Coque M., 2005. Genetic variation and selection for nitrogen use efficiency in maize: a synthesis. *Maydica*, 50: 531-547.
76. Garnett T., Conn V. and Kaiser B.N. 2009. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant, Cell and Environment*, 32: 1272-1283.
77. Garnett T., Plett D., Heuer S. and Okamoto M., 2015. Genetic approaches to enhancing nitrogen-use efficiency (NUE) in cereals: challenges and future directions. *Functionnal Plant Biology*, 42: 921-941.
78. Gaufichon L., Masclaux-Daubresse C., Tcherkez G., Reisdorf-Cren M., Sakakibara Y., Hase T., Clement G., Avice J.C., Grandjean O. and Marmagne A., 2013. *Arabidopsis thaliana* ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant Cell Environ*, 36: 328-342.

79. Glaubitz J.C., Casstevens T.M., Lu F., Harriman J., Eshire R.J., Sun Q., Sun Q. and Buckler E.S., 2014. TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS ONE*, 9: 2.
80. Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M. and Toulmin C., 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327 (5967): 812-818.
81. Good A.G., Shrawat A.K. and Muench D.G., 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Science*, 9: 597-605.
82. Gordon D. and Finch S.J. 2005. Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *Journal of Clinical Investigation*, 115: 1408-1418.
83. Guan M., Moller I.S. and Schjoerring J.K., 2014. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1311-1324.
84. Haefele S.M., Jabbar S.M.A., Siopongco J.D.L.C., Tirol-Padre A., Amarante S.T., Sta Cruz P.C. and Cosico W.C., 2008. Nitrogen use efficiency in selected rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under different water regimes and nitrogen levels. *Field Crops Research*, 107: 137-146.
85. Han B. and Huang X., 2013. Sequencing-based genome-wide association study in rice. *Current opinion in plant biology*, 16(2): 133-138.
86. Han M., Okamoto M., Beatty P.H., Rothstein S.J. and Good A.G., 2015. The Genetics of Nitrogen Use Efficiency in Crop Plants. *Annual Review of Genetics*, 49: 269-289.
87. Han M., Wong J., Su T., Beatty P.H. and Good A.G., 2016. Identification of nitrogen use efficiency genes in barley: searching for QTLs controlling complex physiological traits. *Frontiers in Plant Science*, 7:1587.
88. Hermans C., Hammond J.P., White P.J. and Verbruggen N., 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Science*, 11: 610-617.
89. Hill W.G. and A. Robertson., 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38: 226-231.
90. Hirel B. and Gadal P., 1980. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiology*, 66: 619-623.
91. Hirel B., Le Gouis J., Ney B. and Gallais A., 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2369-2387.
92. Hu B., Wang W., Ou S., Tang J., Li H., Che R., Zhang Z., Chai X., Wang H., Wang Y., Liang C., Liu L., Piao Z., Deng Q., Deng K., Xu C., Liang Y., Zhang L., Li L. and Chu C., 2015. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics*, 47(7): 834.
93. Huang X., Wei X., Sang T., Zhao Q., Feng Q., Zhao Y., Li C., Zhu C., Lu T., Zhang Z., Li M., Fan D., Guo Y., Wang A., Wang L., Deng L., Li W., Lu Y., Weng Q., Liu K., Huang T., Zhou T., Jing Y., Li W., Lin Z., Buckler E.S., Qian Q., Zhang Q-F., Li J. and Han B., 2010. Genome wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature Genetics*, 42: 961-967.
94. Huang X., Zhao Y., Wei X., Li C., Wang A., Zhao Q., Li W., Guo Y., Deng L., Zhu C., Fan D., Lu Y., Weng Q., Liu K., Zhou T., Jing Y., Si L., Dong G., Huang T., Lu T., Feng Q., Qian Q., Li J. and Han B., 2012. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nature Genetics*, 44: 32-39.
95. Huang X. and Han B., 2014. Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. *Annual review of plant biology*, 65: 531-551.
96. INSTAT (Institut National de la Statistique). 2006. Enquête périodique auprès des ménages 2004, Rapport principal. INSTAT, MEFB, UE, Banque Mondiale. 190p.
97. Inthapanya P., Sihavong P., Sihathep V., Chanphengsay M., Fukai S. and Basnayake J., 2000. Genotype differences in nutrient uptake and utilisation for grain yield production of rainfed lowland rice under fertilised and non-fertilised conditions. *Field Crops Research*, 65: 57-68.
98. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate

- Change. In *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds. ML Parry, OF Canziani, JP Palutikof, PJ van der Linden and CE Hanson, 976: Cambridge University Press, Cambridge, UK.
99. Itoh H., Tatsumi T., Sakamoto T., Otomo K., Toyomasu T., Kitano H., Ashikari M., Ichihara S. and Matsuoko M., 2004. A rice semi-dwarf gene, *tan-ginbozu* (d35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. *Plant Molecular Biology*, 54 (4): 533-547.
  100. Izawa T., 2012. Physiological significance of the plant circadian clock in natural field conditions. *Plant Cell Environment*, 35: 1729-1741.
  101. Jay F., 2011. Méthodes bayésiennes en génétique des populations : relations entre structure génétique des populations et environnement. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble. Hal Id, tel-00648601 : 168p.
  102. Jiang G., Hong X., Xu C., Li X. and He Y., 2005. Identification of quantitative trait loci for grain appearance and milling quality using a doubled-haploid rice population. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47: 1391-1403.
  103. Ju C., Buresh R.J., Wang Z., Zhang H., Liu L., Yang J. and Zhang J. 2015. Root and shoot traits for rice varieties with higher grain yield and higher nitrogen use efficiency at lower nitrogen rates application. *Field Crops Research*, 175: 47-55.
  104. Kang H., Wang Y., Peng S., Zhang Y., Xiao Y., Wang D., Qu S., Li Z., Yan S., Wang Z., Liu W., Ning Y, Korniliev P., Leung H., Mezey J., McCouch S.R. and Wang G.L., 2015. Dissection of the genetic architecture of rice resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 17(6): 959-972.
  105. Kawahara Y., de la Bastide M, Hamilton J.P., Kanamori H., McCombie W.R., Ouyang S., Schwartz D.C., Tanaka T., Wu J., Zhou S., Childs K.L., Davidson R.M., Lin H., Quesada-Ocampo L., Vaillancourt B., Sakai H., Lee S.S., Kim J., Numa H., Itoh T., Buell C.R. and Matsumoto T., 2013. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, 6:4.
  106. Kennedy B.W., Quinton M. and Vanarendonk J.A.M., 1992. Estimation of effects of single gene on quantitative traits. *Journal of Animal Science*, 70: 2000-2012.
  107. Kichey T., Hirel B., Heumez E., Dubois F. and Le Gouis J., 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.): post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research*, 102: 22-32.
  108. Kijima Y., Serunkuuma D and Otsuka K. 2006. How revolutionary is “NERICA revolution”? Evidence from Uganda. *The Developing Economies*, 44: 252-267.
  109. Kondo M., Maddala V.R. and Aragones D.V., 2000. Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46: 721-732.
  110. Kong Z., Li M., Yang W., Xu W. and Xue Y. 2006. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant physiology*, 141(4): 1376-1388.
  111. Korte A. and Farlow A., 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9: 29.
  112. Koutroubas S. and Ntanos D., 2003. Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in *Indica* and *Japonica* rice under Mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 83: 251-260.
  113. Krapp A., David L.C., Chardin C., Girin T., Marmagne A. and Leprince A.S., 2014. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65: 789-798.
  114. Krapp A., 2015. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current opinion in Plant biology*, 25: 115-122.
  115. Kumagai E., Araki T., Hamaoka N. and Ueno O., 2011. Ammonia emission from rice leaves in relation to photorespiration and genotypic differences in glutamine synthetase activity. *Annals of Botany*, 108:1381-1386.

116. Kusaba M., Ito H., Morita R., Iida S., Sato Y., Fujimoto M. and Tanaka A., 2007. Rice Non-Yellow Coloring1 is involved in light-harvesting complex and grana degradation during leaf senescence. *The Plant Cell*, 19(4): 1362-1375.
117. Ladha J.K., Pathak H.J., Krupnik T., Six J. and Van Kessel C., 2005. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. *Advances in Agronomy*, 87: 85-156.
118. Lafarge T., Bueno C., Frouin J., Jacquin L., Courtois B. and Ahmadi N., 2017. Genome-wide association analysis for heat tolerance at flowering detected a large set of genes involved in adaptation to thermal and other stresses. *PLoS ONE*, 12: 2.
119. Lafitte R.H., Champoux M.C., McLaren G. and O'Toole J.C., 2001. Rice root morphological traits are related to isozyme groups and adaptation. *Field Crops Research*, 71: 57-70.
120. Le Gouis J. 2007. Déterminisme génétique de l'adaptation à une alimentation azotée sub-optimale. HDR. Université des sciences et technologies de Lille. 59 p.
121. Le Gouis J., Beghin B., Heumez E. and Pluchard P., 2000. Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal Agronomy*, 12: 163-173.
122. Le Gouis J., Gaju O., Hubbart S., Allard V., Orford S., Heumez E., Bogard M., Griffiths S., Wingen L., Semenov M., Martre P., Snape J. and Foulkes J., 2010. Genetic improvement for an increased nitrogen use efficiency in wheat. *Aspects of Applied Biology*, 105: 151-158.
123. Lea P.J. and Forde B.G., 1994. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 17: 541-556.
124. Lea P.J. and Azevedo R.A., 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil, *Annals of Applied Biology*, 149: 243-247.
125. Lea P.J., Sodek L., Parry M.A.J., Shewry P.R. and Halford N.G., 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150: 1-26.
126. Lee J.H., Kang C.S., Roh A.S., Park K.Y. and Lee H.J., 2010. Assessment of N topdressing rate at panicle initiation stage with chlorophyll meter-based diagnosis in rice. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12: 195-200.
127. Lee J.S., Sajise A.G.C., Gregorio G.B., Kretschmar T., Ismail A. and Wissuwa M., 2017. Genetic dissection for zinc deficiency tolerance in rice using bi-parental mapping and association analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 12.
128. Lee J.S., Wissuwa M., Zamora O.B., Ismail A.M. 2018. Novel Sources of aus Rice for zinc deficiency tolerance identified through association analysis using high-density SNP array. *Rice Science*, 25(5): 293-296.
129. Lee S., Kim, J., Han, J. J., Han, M. J. and An G., 2004. Functional analyses of the flowering time gene OsMADS50, the putative suppressor of overexpression of CO1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20) ortholog in rice. *The Plant Journal*, 38(5): 754-764.
130. Lewontin R.C., 1964. The Interaction of Selection and Linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, 49: 49-67.
131. Li H., Yuan Z., Vizcay-Barrena G., Yang C., Liang W., Zong J and Zhang D., 2011. Persistent tapetal cell1 encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant physiology*, 156(2): 615-630.
132. Li H., Hu B. and Chu C., 2017. Nitrogen use efficiency in crops: lessons from Arabidopsis and rice. *Journal of Experimental Botany*, 68 (10): 2477-2488.
133. Li J.Y., Wang J. and Zeigler R.S., 2014. The 3000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. *Giga Science*, 3(1): 8.
134. Li P., Chen F., Cai H., Liu J., Pan Q., Liu Z., Gu R., Mi G., Zhang F. and Yuan L., 2015 a. A genetic relationship between nitrogen use efficiency and seedling root traits in maize as revealed by QTL analysis. *Journal of Experimental Botany*, 66(11): 3175-3188.
135. Li Y., Li M., Cao G. and Han L., 2010. Effects of genetic background on expression of QTL for nitrogen efficiency in irrigated rice and upland rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(21): 4331-4340.

136. Li Y., Fan C., Xing Y., Jiang Y., Luo L., Sun L. and Zhang Q., 2011. Natural variation in GS5 plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genetics*, 43(12): 1266-1269.
137. Li Y., Ouyang J., Wang Y.Y., Hu R., Xia K., Duan J., Wang Y., Tsay Y.F., Zhang M., 2015 b. Disruption of the rice nitrate transporter OsNPF2.2 hinders root-to-shoot nitrate transport and vascular development. *Scientific reports*, 5: 9635.
138. Lightfoot D.A., Mungur R., Ameziane R., Nolte S., Long L., Bernhard K., Colter A., Jones J., Iqbal M. J., Varsa E. and Young B., 2007. Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (GDHA) of *E. coli*. *Euphytica*, 14 p.
139. Lima J.E., Kojima S., Takahashi H. and Von Wieren N., 2010. Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an Ammonium Transporter1; 3 -dependent manner. *Plant Cell*, 22: 3621-3633.
140. Liu J., You L., Amini M., Obersteiner M., Herrero M., Zehnder A.J.B. and Yang H., 2010. A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. *Proceedings of the National Academy of Science*, 107: 8035-8040.
141. Liu Z., Zhu C., Jiang Y., Tian Y., Yu J., An H., Tang W., Sun J., Tang J., Chen G., Zhai H., Wang C. and Wan J., 2016. Association mapping and genetic dissection of nitrogen use efficiency-related traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Functional and Integrative Genomics*, 16(3): 323-333.
142. Luo J., Liu H., Zhou T., Gu B., Huang X., Shangguan Y., Zhou J., Li Y., Zhao Y., Wang Y., Zhao Q., Wang A., Wang Z., Sang T., Wang Z. and Han B., 2013. An-1 encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size, and grain number in rice. *The Plant Cell*, 25 (9): 3360-3376.
143. Lynch J., 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology*, 109: 7-13.
144. Lynch J., 2013. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Annals of Botany*, 112: 347-357.
145. Ma X., Feng F., Wei H., Mei H., Xu K., Chen S., Li T., Liang X., Liu H. and Luo L., 2016. Genome-wide association study for plant height and grain yield in rice under contrasting moisture regimes. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1801.
146. Mae T., 1997. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant Soil*, 196: 201-210.
147. Mae T. and Ohira K., 1981. The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 22: 1067-1074.
148. Mae T., Makino A. and Ohira K. 1983. Changes in the amounts of ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 24: 1079-1086.
149. MAEP (Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche), 2007. Recensement de l'agriculture (RA). Campagne agricole 2004-2005. Parcelles et superficies de culture. Vol. III : 343.
150. MAEP (Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche), 2004. Filière Riz. Filières de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche. UPDR / Ocean Consultant. Fiche n°114 :15 p.
151. Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L. and Akira S., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105: 1141-1157.
152. Mather K.A., Caicedo A.L., Polato N.R., Olsen K.M., McCouch S. and Purugganan M.D., 2007. The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics*, 177: 2223-2232.
153. McCouch S.R., Wright M.H., Tung C.W., Maron L.G., McNally K.L., Fitzgerald M., Singh N., DeClerck G., Agosto-Perez F., Korniliev P., Greenberg A.J., Naredo M.E.B., Mercado S.M.Q., Harrington S.E., Shi Y., Branchini D.A., Kuser-Falcao P.R., Leung H., Ebana K., Yani M., Eizenga G., McClung A. and Mezey J., 2016. Open access resources for genome-wide association mapping in rice. *Nature Communications*, 7: 10532.
154. Meuwissen T.H.E., Hayes B.J. and Goddard M.E., 2001. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. *Genetics*, 157: 1819-1829.
155. Meyer C. and Stitt M., 2001. Nitrate reductase and signalling. In: Lea PJ, Morot-Gaudry J-F, eds. *Plant nitrogen*. New York: Springer, 37-59.

156. Mi G., Liu J., Chen F., Zhang F., Cui Z. and Liu X., 2003. Nitrogen uptake and remobilization in maize hybrids differing in leaf senescence. *Journal of Plant Nutrition*, 26: 447-459.
157. Michellon R., Husson O., Moussa N., Randrianjafizanaka M.T., Naudin K., Letourmy P., Andrianaivo A.P., Rakotondramanana, Raveloarijaona N., Enjalric F., Penot E. and Séguy L., 2011. *Striga asiatica*: a driving-force for dissemination of conservation agriculture systems based on *Stylosanthes guianensis* in Madagascar. 5<sup>th</sup> World Congress of Conservation Agriculture incorporating 3<sup>rd</sup> Farming Systems Design Conference, September 2011, Brisbane, Australia.
158. Min Agri (Ministère de l'Agriculture), 2016. Stratégie nationale de développement de la filière semences riz à Madagascar. 58 p.
159. Minten B., Randrianarisoa J.C. and Barrett C.B., 2007. Productivity in Malagasy rice systems: wealth-differentiated constraints and priorities. *Agriculture and Economy*, 37: 225-237.
160. Moll R.H., Kamprath E.J. and Jackson W.A., 1982. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, 74: 562-564.
161. Morot-Gaudry J.F., Orsel M., Diaz C., Daniel-Vedele F. and Masclaux-Daubresse C., 2006. Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes: intérêt pour le colza. *OCL (Oilseed and fats, Crops and Lipids)*, 13 (6): 10 p.
162. Mu X.H., Chen F.J., Wu Q.P., Chen Q.W., Wang J.F., Yuan L.X. and Mi G.H., 2015. Genetic improvement of root growth increases maize yield via enhanced post-silking nitrogen uptake. *European Journal of Agronomy*, 63: 55-61.
163. Murphy K.M., Campbell K.G., Lyon S.R. and Jones S.S., 2007. Evidence of varietal adaptation to organic farming systems. *Field Crops Research*, 102 (3): 172-177.
164. Nachman M.W., 2002. Variation in recombination rate across the genome: evidence and implications. *Current opinion in genetics and development*, 12(6): 657-663.
165. Nguyen V.N., Moon S. and Jung K.H., 2014. Genome-wide expression analysis of rice ABC transporter family across spatio-temporal samples and in response to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 171 (14): 1276-1288.
166. Nguyen H.T.T., Dang T.T., Van-Pham C. and Bertin P., 2016. QTL mapping for nitrogen use efficiency and related physiological and agronomical traits during the vegetative phase in rice under hydroponics. *Euphytica*, 212(3): 473-500.
167. O'Toole J. and Bland W., 1987. Genotypic variation in crop plant root systems. *Advances in Agronomy*, 41: 91-145.
168. Obara M., Kajiura M., Fukuta Y., Yano M., Hayashi M., Yamaya T. and Sato T., 2001. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa L.*). *Journal of Experimental Botany*, 52:1209-1217.
169. Obara M., Sato T., Sasaki S., Kashiba K., Nagano A., Nakamura I., Ebitani T., Yano M. and Yamaya T., 2004. Identification and characterization of a QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 1-11.
170. OCDE and FAO, 2016. L'agriculture en Afrique subsaharienne : Perspectives et enjeux de la décennie à venir. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO. Partie I. Chapitre 2. 43 p.
171. Ogawa S., Suzuki Y., Yoshizawa R., Kanno K. and Makino A., 2011. Effect of individual suppression of RBCS multigene family on Rubisco contents in rice leaves. *Plant Cell and Environment*, 35(3): 546-553.
172. Ohashi M., Ishiyama K., Kojima S., Konishi N., Nakano K., Kanno K., Hayakawa T. and Yamaya T., 2015. Asparagine Synthetase1, but not Asparagine Synthetase2, is responsible for the biosynthesis of Asparagine following the supply of Ammonium to rice roots. *Plant Cell Physiology*, 56 (4): 769-778.
173. Orsel M., Filleur S., Fraisier V. and Daniel-Vedele F., 2002. Nitrate transport in plants: which gene and which control? *Journal of Experimental Botany*, 53: 825-833.



174. Pan S., Liu H., Mo Z., Patterson B., Duan M., Tian H., Hu S. and Tang X., 2016. Effects of nitrogen and shading on root morphologies, nutrient accumulation, and photosynthetic parameters in different rice genotypes. *Scientific Reports*, 6: 32148.
175. Peltier M., 1970. Les dénominations variétales du riz cultivé (*Oryza sativa L.*) à Madagascar. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*, XVII: 469-486.
176. Phung N.T, Mai C.D, Hoan G.T, Truong H.T, Lavarenne J., Gonin M., Nguyen K.L., ha T.T., Do V.N., Gantet P. and Courtois B., 2016. Genome-wide association mapping for root traits in a panel of rice accessions from Vietnam. *BMC Plant Biology*, 16: 64.
177. Piao Z., Cho Y.I. and Koh H.J., 2001. Inheritance of physiological nitrogen-use efficiency and relationship among its associated characters in rice. *Korean Journal of Breeding Science*, 33: 332-337.
178. Pli, 1990. Protection intégrée en riziculture au Lac Alaotra. Rapport d'activité Numéro 6: 43-57.
179. Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M., Weinblatt M.E., Shadick N.A. and Reich D., 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38: 904-909.
180. Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
181. Pu C.X., Ma Y., Wang J., Zhang Y.C., Jiao X.W., Hu Y.H. and Sun Y., 2012. Crinkly4 receptor-like kinase is required to maintain the interlocking of the palea and lemma, and fertility in rice, by promoting epidermal cell differentiation. *The plant journal*, 70(6): 940-953.
182. Qiu X., Xie W., Lian X. and Zhang Q., 2009. Molecular analyses of the rice glutamate dehydrogenase gene family and their response to nitrogen and phosphorous deprivation. *Plant Cell Reports*, 28 : 1115-1126.
183. Rabeharisoa R.L., 2004. Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des Hautes Terres de Madagascar. Thèse de doctorat d'État, Université d'Antananarivo, Faculté des sciences. 213 p.
184. Raboin L.M., Ramanantsoanirina A., Dusserre J., Razasolofonahary F., Tharreau D., Lannou C. and Sester M., 2012. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. *Plant pathology*, 61: 1103-1111.
185. Raboin L.M., Ramanantsoanirina A., Dzido J.L., Radanielina T., Tharreau D., Dusserre J. et Ahmadi N., 2013. Création variétale pour la riziculture pluviale à Madagascar: bilan de 25 années de sélection. *Cahiers Agricultures*, 22: 450-458.
186. Raboin L.M., Randriambololona T., Radanielina T., Ramanantsoanirina A., Ahmadi N. and Dusserre J., 2014. Upland rice varieties for smallholder farming in the cold conditions in Madagascar's tropical highlands. *Field Crops Research*, 169: 11-20.
187. Raboin L.M., Ballini E., Tharreau D., Ramanantsoanirina A., Frouin J., Courtois B. and Ahmadi N., 2016. Association mapping of resistance to rice blast in upland field conditions. *Rice*, 9: 59.
188. Radanielina T., Ramanantsoanirina A., Raboin L.M. et Ahmadi N., 2013. Déterminants de la diversité variétale du riz dans la région de Vakinankaratra (Madagascar). *Cahiers Agriculture*, 22: 1-8.
189. Rafalski A., 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 94-100.
190. Rakotoson T., Dusserre J., Letourmy P., Ratsimiala I.R., Cao T.V., Ramanantsoanirina A., Roumet P., Ahmadi N. and Raboin L.M., 2017. Genetic variability of nitrogen use efficiency in rainfed upland rice. *Field Crops Research*, 213: 194-203.
191. Randriamanantsoa R., Raharinindrina S., Razafintseheno B.H., Rabary B., Blanchart E., Rafamatanantsoa E. and Rakotosoloho H., 2014. White grubs are not all harmful: case study of *Hexodon unicolor* and *Heteroconus paradoxus*, Coleoptera, Dynastidae on the Highlands of Madagascar. Conférence AfA 2014, Agroecology for Africa, 3-7/11/2014, Antananarivo, Madagascar.
192. Randriamanantsoa R., Aberlenc H. P., Bakoly R.O., Ratnadass A. et Vercambre B., 2010. Les larves des *Scarabaeoidea (Insecta, Coleoptera)* en riziculture pluviale des régions de haute et moyenne altitudes du Centre de Madagascar. *Zoosystema*, 32 (1): 19-72.

193. Randrianjafizanaka M.T., Autfray P., Andrianaivo A.P., Ramonta I.R. and Rodenburg J., 2018. Combined effects of cover crops, mulch, zero-tillage and resistant varieties on *Striga asiatica* (L.) Kuntze in rice-maize rotation systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 256: 23-33.
194. Rasolofo L., Dusserre J, Salgado P., Razafimbelo T. et Naudin K., 2018. Impact des innovations agro-écologiques sur le rendement en grain des cultures pluviales. *Akon'ny Ala*, 34: 13-26.
195. Ratnadass A., Razafindrakoto C.R., Andriamizehy H., Ravaomanarivo L.H.R., Rakotoarisoa H.L., Ramahandry F., Ramarofidy M., Randriamanantsoa R., Dzido J.L. and Rafaraso L.S., 2012. Protection of upland rice at Lake Alaotra (Madagascar) from black beetle damage (*Heteronychus plebejus*) (*Coleoptera: dynastidae* by Seed Dressing). *African Entomology*, 20 (1): 177-181.
196. Raun W.R. and Johnson G.V., 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal*, 91 (3): 357-363.
197. Ravaonoro S., Ravatomanga J., Rakotonjanahary X. and Randrianarivony H., 1999. Report on Rice germplasm collection in Madagascar. FOFIFA, SDC, IRRI, Antananarivo, 17 p.
198. Raveloson H., Rafenomanjato A., Ramanantsoanirina A., Sester M., et Raboin L.M., 2016. Gestion de la diversité variétale du riz pluvial pour contrôler la pyriculariose. In : Duchaufour H., Razafimbelo T., Rakotoarisoa J., Ramamonjisoa B. et Rakotondravao (Ed.) : Recherche interdisciplinaire pour le développement durable et la biodiversité des espaces ruraux malgaches. Application à différentes thématiques de territoire. Actes du projet FSP PARRUR, 137-167.
199. Raveloson H., Ratsimiala R.I., Tharreau D. and Sester M., 2017. Long-term survival of blast pathogen infected rice residues as major source of primary inoculum in high altitude upland ecology. *Plant Pathology*, 67: 610-618.
200. Risterucci A., Grivet L., N'goran J., Pieretti I., Flament M. and Lanaud C., 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 948-955.
201. Sadras V. and Calderini D. 2014. *Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy*. 564 p.
202. Sage R.F., Percy R.W. and Seeman J.R., 1987. The nitrogen use efficiency in C3 and C4 plants. *Plant Physiology*, 85: 355-359.
203. Saito K., Linquist B., Atlin G.N., Phanthaboon K., Shiraiwa T. and Horie T., 2006. Response of traditional and improved upland rice cultivars to N and P fertilizer in northern Laos. *Field Crops Research*, 96: 216-223.
204. Saito K. and Futakuchi K., 2009. Performance of diverse upland rice cultivars in low and high soil fertility conditions in West Africa. *Field Crops Research*, 111: 243-250.
205. Saitou N. and Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4: 406.
206. Schmidt R., Schippers J. H. M., Mieulet D., Obata T., Fernie A. R., Guiderdoni E. and Mueller-Roeber B., 2013. MULTIPASS, a rice R2R3-type MYB transcription factor, regulates adaptive growth by integrating multiple hormonal pathways. *The Plant Journal*, 76 (2): 258-273.
207. Seguin M., Attard A., Bataillon T., Billot C., Cenci A., Chantret N., Courtois B., David J., Deu M., El Azhari N., Glaszmann J-C., Glemin S., Haudry A., Le Guen V., Maynadier M., Pomiès V., Ronfort J., Tsitronne A et Weber C., 2006. Analyse et prédiction des patrons de déséquilibre de liaison dans les collections de ressources génétiques de plantes pérennes ou annuelles, autogames ou allogames. *Les Actes du BRG*, 6 : 57-74.
208. Senthilvel S., Vinod K.K., Malarvizhi P. and Maheswaran M., 2008. QTL and QTL x environment effects on agronomic and nitrogen acquisition traits in rice. *Journal of integrative plant biology*, 50(9): 1108-1117.
209. Sester M., Raveloson H., Tharreau D. and Dusserre J., 2014. Conservation agriculture cropping system to limit blast disease in upland rainfed rice. *Plant pathology*, 63(2): 373-381.
210. Shan Y.H., Wang Y.L. and Pan X.B., 2005. Mapping of QTLs for nitrogen use efficiency and related traits in rice (*Oryza sativa* L). *Acta Agron Sinica*, 4(10): 72-727.
211. Shin J.H., Blay S., McNeney B. and Graham J., 2006. LDheatmap: an R function for graphical display of pairwise linkage disequilibria between single nucleotide polymorphisms. *Journal of Statistical Software*, 16 (3): 1-10.
212. Shomura A., Izawa T., Ebana K., Ebitani T., Kanegae H., Konishi S. and Yano M., 2008. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics*, 40(8): 1023-1028.

213. Si L., Chen J., Huang X., Gong H., Luo J., Hou Q., Zhou T., Lu T., An X., An G. and Han B., 2016. OsSPL13 controls grain size in cultivated rice. Advance online publication. *Nature Genetics*, 48: 447-456.
214. Singh U., Ladha J.K., Castillo E.G., Punzalan G., Tirol-Padre A. and Duqueza M., 1998. Genotypic variation in nitrogen use efficiency in medium and long duration rice. *Field Crops Research*, 58: 35-53.
215. Skamnioti P. and Gurr S.J., 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends in Biotechnology*, 27: 141-150.
216. Smith S. and De Smet I., 2012. Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical Transactions Royal Society B*, 367: 1441-1452.
217. Sonoda Y., Ikeda A., Saiki S., Yamaya T., Yamaguchi J., 2003. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. *Plant Cell and Physiology*, 44: 1396-1402.
218. Spindel J., Begum H., Akdemir D., Virk P., Collard B., Redona E., Atlin G., Jannink J.L. and McCouch S.R., 2015. Genomic selection and association mapping in rice (*Oryza sativa*): effect of trait genetic architecture, training population composition, marker number and statistical model on accuracy of rice genomic selection in elite, tropical rice breeding lines. *PLoS Genet*, 11: 6.
219. Spindel J.E., Begum H., Akdemir D., Collard B., Redoña E., Jannink J.L. and McCouch S., 2016. Genome-wide prediction models that incorporate de novo GWAS are a powerful new tool for tropical rice improvement. *Heredity*, 116(4): 395.
220. Storey J.D. and Tibshirani R., 2003. Statistical significance for genome-wide studies. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 100: 9440-9445.
221. Suenaga A., Moriya K., Sonoda Y., Ikeda A., Von Wirén N., Hayakawa T., Yamaguchi J. and Yamaya T., 2003. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 44: 206-211.
222. Tabuchi M., Sugiyama K., Ishiyama K., Inoue E., Sato T., Takahashi H. and Yamaya T., 2005. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant Journal*, 42 (5): 641-51.
223. Tabuchi M., Abiko T. and Yamaya T., 2007. Assimilation of ammonium ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58: 2319-2327.
224. Takeda T., Toyofuku K., Matsukura, C. and Yamaguchi J., 2001. Sugar transporters involved in flowering and grain development of rice. *Journal of plant physiology*, 158(4): 465-470.
225. Tamura W., Kojima S., Toyokawa A., Watanabe H., Tabuchi-Kobayashi M., Hayakawa T. and Yamaya T., 2011. Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Frontiers in Plant Science*, 2: 57.
226. Tang Z., Fan X., Li Q., Feng H., Miller A. J., Shen Q. and Xu G., 2012. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. *Plant Physiology*, 160(4): 2052–2063.
227. Tester M. and Langridge P., 2010. Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science*, 327 (5967): 818-822.
228. Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R. and Polasky S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418: 671-677.
229. Tilman D., Balzer C. and Hill J., 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 20260-20264.
230. Tirol-padre A., Ladha J.K., Singh U., Laureles E., Punzalan G. and Akita S., 1996. Grain yield performance of rice genotypes at suboptimal levels of soil N as affected by N uptake and utilization efficiency. *Field Crops Research*, 46: 127-143.
231. Tsay Y.F., Chiu C.C., Tsai C.B., Ho C.H. and Hsu P.K., 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*, 581: 2290-2300.
232. Uauy C., Brevis J.C. and Dubcovsky J., 2006. The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2785-2794.

233. Van Liere J.M. and Rosenberg N.A., 2008. Mathematical properties of the  $r^2$  measure of linkage disequilibrium. *Theoretical population biology*, 74(1):130-137.
234. Van Sanford D.A. and Mackown C.T., 1986. Variation in nitrogen use efficiency among soft red winter wheat genotypes. *Theor Appl Genet*, 72: 158-163.
235. Von Wiren N., Gazzarrini S., Gojont A. and Frommer W.B., 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion of Plant Biology*, 3: 254-261.
236. Vose P.B., 1990. Screening techniques for plant nutrient efficiency: Philosophy and methods. In: El Bassam N et al (Eds), *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 283-289.
237. Waines J. G. and Ehdai B., 2007. Domestication and crop physiology: roots of green-revolution wheat. *Annals of Botany*, 100: 991-998.
238. Wang C., Yang Y., Yuan X., Xu Q., Feng Y., Yu H., Wang Y. and Wei X., 2014. Genome wide association study of blast resistance in *indica* rice. *BMC Plant Biology*, 14: 311.
239. Wang E., Wang J., Zhu X., Hao W., Wang L., Li Q. and He Z., 2008. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics*, 40(11): 1370-1374.
240. Wang M.Y., Class A.D.M., Shaff J.E. and Kochian L.V., 1994. Ammonium Uptake by rice roots. *Plant Physiology*, 104: 899-906.
241. Wang Y.Y., Hsu PK and Tsay Y.F., 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Science*, 17(8): 458-467.
242. Wei D., Cui K.H., Pan J.F., Ye G.Y., Xiang J., Nie L.X. and Huang J.L., 2011. Genetic dissection of grain nitrogen use efficiency and grain yield and their relationship in rice. *Field Crops Research*, 124: 340-346.
243. Wei D., Cui K., Ye G., Pan J., Xiang J., Huang J. and Nie L., 2012. QTL mapping for nitrogen use efficiency and nitrogen deficiency tolerance traits in rice. *Plant Soil*, 359: 281-295.
244. Wen W., Mei H., Feng F., Yu S., Huang Z., Wu J., Chen L., Xu X. and Luo L., 2009. Population structure and association mapping on chromosome 7 using a diverse panel of Chinese germplasm of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 459-470.
245. Whitehead D.C. and Raistrick N., 1990. Ammonia volatilization from five nitrogen compounds used as fertilizers following surface application to soils. *Journal of Soil Science*, 41: 387-394.
246. Wirth J., Chopin F., Santoni V., Viennois G., Tillard P., Krapp A., Lejay L., Daniel-Vedele F. and Gojon A., 2007. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 23541-23552.
247. Witt C., Dobermann A., Abdurachman S., Gines H.C., Wang Guanghuo., Nagarajan R., Satawatananont S., Tran Thuc Son., Pham Sy Tan., Le Van Tiem., Simbahan G.C. and Olk D.C., 1999. Internal nutrient efficiencies of irrigated lowland rice in tropical and subtropical Asia. *Field Crops Research*, 63(2): 113-138.
248. Wu L., Yuan S., Huang L., Sun F., Zhu G., Li G., Fahad S., Peng S. and Wang F., 2016. Physiological mechanisms underlying the high-grain yield and high-nitrogen use efficiency of elite rice varieties under a low rate of nitrogen application in China. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1024.
249. Xu G., Fan X. and Miller J.A., 2012. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 153-182.
250. Yamaya T., Obara M., Nakajima H., Sasaki S., Hayakawa T., Sato T., 2002. Genetic manipulation and quantitative trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of Experimental Botany*, 53: 917-925.
251. Yan M., Fan X., Feng H., Miller A.J., Shen Q. and Xu G., 2011. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant, Cell and Environment*, 34(8): 1360-1372.
252. Yang C., Yang L., Yang Y. and Ouyang Z., 2004. Rice root growth and nutrient uptake as influenced by organic manure in continuously and alternately flooded paddy soils. *Agriculture and Water Management*, 70: 67-81.

253. Yang J., Lee S., Hang R., Kim S. R., Lee Y. S., Cao X. and An G., 2013. OsVIL 2 functions with PRC 2 to induce flowering by repressing O s LFL 1 in rice. *The Plant Journal*, 73(4): 566-578.
254. Yang W., Guo Z, Huang C, Wang K, Jiang N, Feng H, chen G, Liu Q and Xiong L., 2015. Genome-wide association study of rice (*Oryza sativa* L.) leaf traits with a high-throughput leaf scorer. *Journal of Experimental Botany*, 66 (18): 5605-5615.
255. Yang Z., Zhang Y., Sun L., Zhang P., Liu L., Yu P. and Cheng S., 2018. Identification of cyp703a3-3 and analysis of regulatory role of CYP703A3 in rice anther cuticle and pollen exine development. *Gene*, 649: 63-73.
256. Yano M., Katayose Y., Ashikari M., Yamanouchi U., Monna L., Fuse T., Baba T., Yamamoto K., Umehara Y., Nagamura Y. and Sasaki T., 2000. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. *Plant Cell*, 12: 2473-2483.
257. Yano K., Yamamoto E., Aya K., Takeuchi H., Lo P.C., Hu L., Yamasaki M., Yoshida S., Kitano H., Hirano K. and Matsuoka M. 2016. Genome-wide association study using whole-genome sequencing rapidly identifies new genes influencing agronomic traits in rice. *Nature Genetics*, 48: 927-934.
258. Yu J. and Buckler E.S., 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 155-160.
259. Yu J., Pressoir G., Briggs W.H., Bi I.V., Yamasaki M., Doebley J.F., McMullen M.D., Gaut B.S., Nielsen D.M., Holland J.B., Kresovich S. and Buckler E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature genetics*, 38(2): 203.
260. Zaharah A.R. and Hanafi M.M., 2009. Upland rice root characteristics and their relationship to nitrogen uptake. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 32: 261-266.
261. Zaharah A.R. and Hanafi M.M., 2014. Evaluation of upland rice genotypes for efficient uptake of nitrogen and phosphorus. In: International Atomic Energy Agency, *Optimizing Productivity of Food Crop Genotypes in Low Nutrient Soils*, IAEATECDOC-1721, IAEA. Vienna. 287-299.
262. Zhang H. and Forde B.G., 1998. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279: 407-409.
263. Zhang P., Zhong K., Shahid M.Q. and Tong H., 2016. Association analysis in rice: from application to utilization. *Frontiers in plant science*, 7: 1202.
264. Zhang Q., Yang Z., Zhang H. and Yi J., 2012. Recovery efficiency and loss of 15 N-labelled urea in a rice-soil system in the upper reaches of the Yellow River basin. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 158: 118-126.
265. Zhang S-W., Li C-H., Cap J., Zhang Y-C., Zhang S-Q., Xia Y-F., Sun D-Y. and Sun Y., 2009. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by tld1/OsGH3.13 activation. *Plant Physiology*, 151: 1889-1901.
266. Zhang Z., Ersoz E., Lai C.Q., Todhunter R.J., Tiwari H.K., Gore M.A., Bradbury P.J., Yu J., Arnett D.K., Ordovas J.M. and Buckler E.S., 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 42: 355-360.
267. Zhao K., Aranzana M.J., Kim S., Lister C., Shindo C., Tang C., Toomajian C., Zheng H., Dean C., Marjoram P. and Nordborg M., 2007. An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *Plos Genetics*, 3: 71-82.
268. Zhao K., Tung C.W., Eizenga G.C., Wright M.H., Ali Md.L., Price A.H., Norton G.J., Islam M.R., Reynolds A., Mezey J., McClung A.M., Bustamante C.D. and McCouch S.R., 2011. Genome-wide association mapping reveals rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communication*, 2: 467.
269. Zhao M., Song J., Wu A., Hu T., Li J., 2018. Mining beneficial genes for aluminum tolerance within a core collection of rice landraces through genome-wide association mapping with high density SNPs from specific-locus amplified fragment sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1838.
270. Zhao X., Huang, J., Yu, H., Wang, L. and Xie W., 2010. Genomic survey, characterization and expression profile analysis of the peptide transporter family in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*, 10: 92.

271. Zhao X.Q. and Shi V.M., 2006. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Science*, 170 (4): 748-754.
272. Zheng W., Liu Z., Zhang M., Shi Y., Zhu Q., Sun Y., Zhou H., Li C., Yang Y. and Geng J., 2017 a. Improving crop yields nitrogen use efficiencies, and profits by using mixtures of coated controlled-released and uncoated urea in a wheat-maize system. *Field Crops Research*, 205: 106-115.
273. Zheng X.M., Gong T., Ou H.L., Xue D., Qiao W., Wang J., Liu S., Yang Q. and Olsen K.M., 2017 b. Genome-wide association study of rice grain width variation. *Genome*, 61: 233-240.
274. Zhou Y., Tao Y., Tang D., Wang J., Zhong J., Wang Y., Yuan Q., Yu X., Zhang Y., Wang Y., Liang G. and Dong G., 2017. Identification of QTL associated with nitrogen uptake and nitrogen use efficiency using high throughput genotyped CSSLS in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8: 1166.
275. Zhu C., Gore M., Buckler E.S., Yu J., 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *The plant genome*, 1: 1.
276. Zhu D., Kang H, Li Z, Liu M, Zhu X, Wang Y, Wang D, Wang Z, Liu W., and Wang G.L., 2016. A genome-wide association study of field resistance to *Magnaporthe Oryzae* in rice. *Rice*, 9: 44.

### Webographie:

http 1: FAO, 2009. FAOSTAT. Available at <http://faostat.fao.org>.

http 2: FAO, 2010. Suivi du marché du riz. <http://fao.org/docrep/012/a1186f/a1186f00.pdf>.

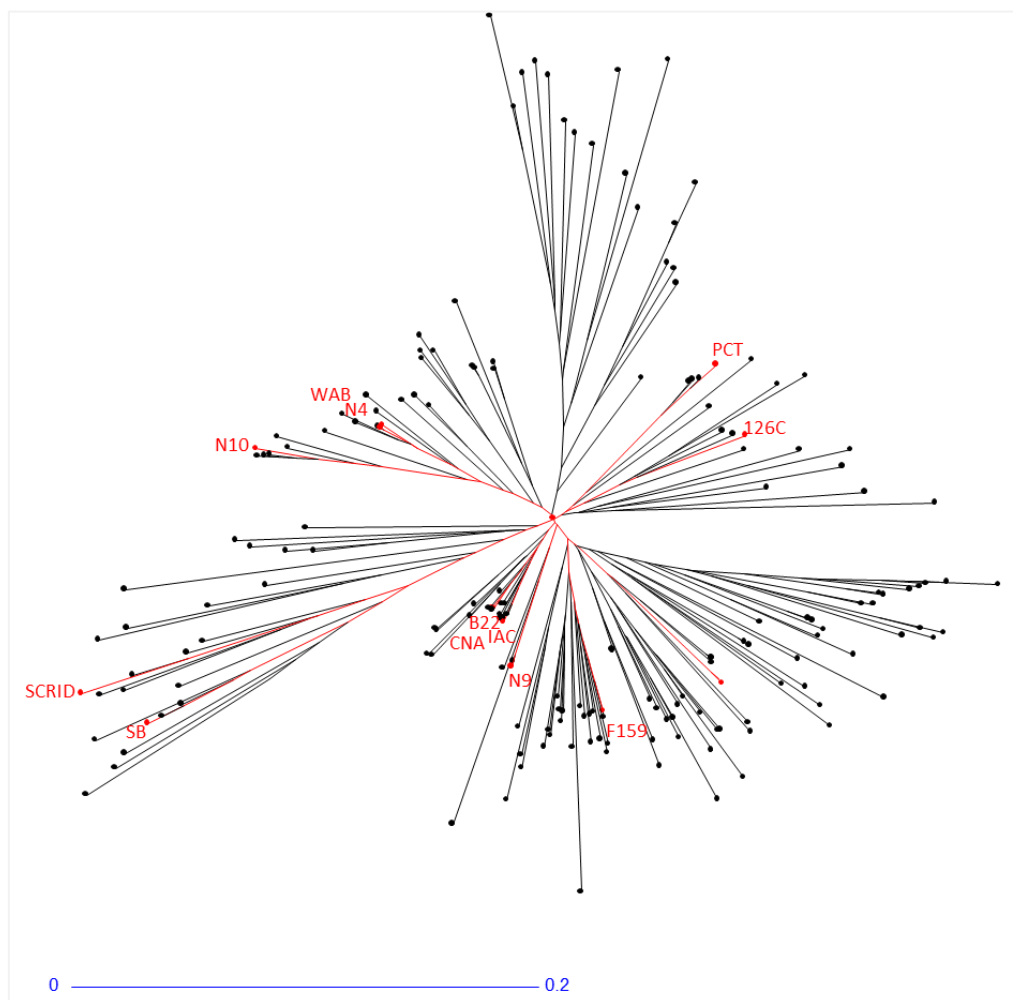
http 3: Perrier X. and Jacquemoud-Collet J.P. 2006. DARwin software. Available online at <http://darwin.cirad.fr/darwin>.

## ANNEXES

## ANNEXES

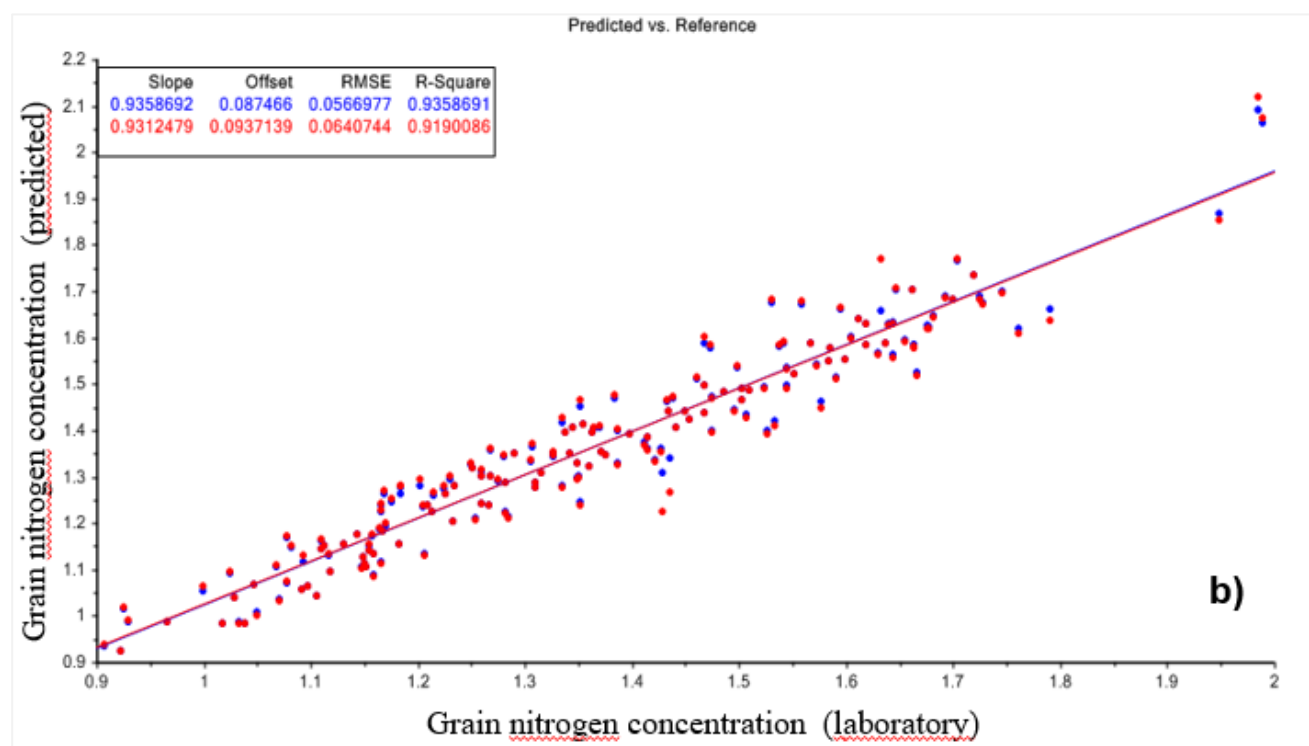
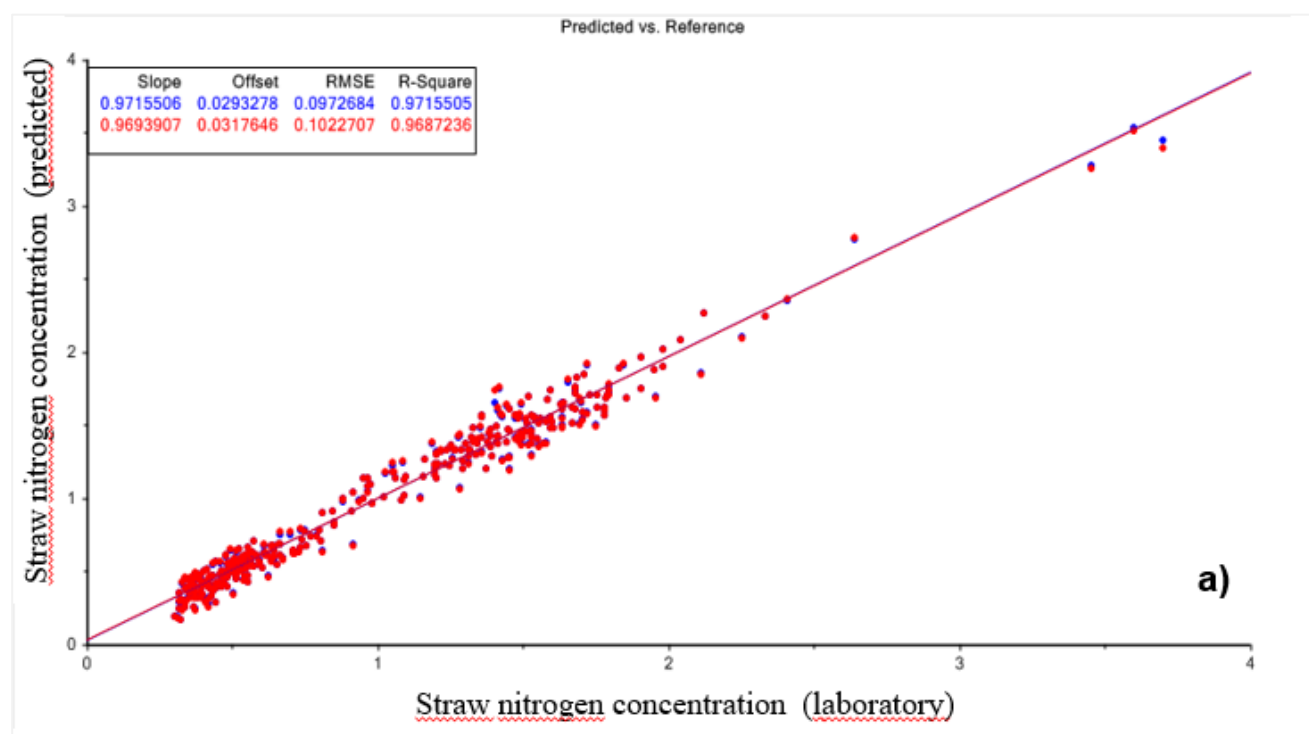
### Annexe 1: Diversité génétique des 13 variétés de riz étudiées et équation de calibration pour la concentration en azote dans les grains et pailles lors de l'essai préliminaire

a) Représentation de la diversité génétique des 13 variétés de riz étudiées (en rouge) au sein du panel





## b) Équation de calibration pour la concentration de l'azote dans les pailles et les grains



## Annexe 2: Valeur phénotypique des 21 caractères étudiés et valeur de la corrélation entre NUE, ses composantes et le rendement en grains lors de l'essai préliminaire

a) Valeur phénotypique moyenne par variété des 21 caractères, par année et par niveaux d'azote avec le rang de chaque variété

Caractères	Variété	2013				2014				2015				Moyenne (3 années)			
		HN	Rang	LN	Rang	HN	Rang	LN	Rang	HN	Rang	LN	Rang	HN	Rang	LN	Rang
AEN	126C409	11,17	7			0,62	7			11,13	8			7,64	8		
AEN	B22	13,74	5			1,85	5			12,96	5			9,51	4		
AEN	CNA4136	9,96	9			17,17	1			2,98	12			10,04	3		
AEN	F159	16,22	2			-3,80	11			15,01	3			9,14	5		
AEN	IAC25	8,01	10			10,45	2			-3,63	13			4,94	12		
AEN	N10	10,11	8			-4,14	12			15,41	2			7,13	9		
AEN	N4	19,74	1			-0,28	10			14,42	4			11,30	1		
AEN	N9	13,89	4			1,01	6			9,24	9			8,05	7		
AEN	PCT11	5,95	13			-5,45	13			7,98	10			2,83	13		
AEN	PRIMA	13,36	6			2,32	4			16,75	1			10,81	2		
AEN	SCRID195	6,47	11			0,16	8			11,78	7			6,13	10		
AEN	SEB402	14,57	3			2,55	3			7,17	11			8,10	6		
AEN	WAB880	6,35	12			-0,20	9			12,11	6			6,09	11		
BFLO	126C409	7 099,90	12	6 131,35	12	7 167,19	12	6 626,25	11	6 666,15	11	4 731,67	12	6 977,74	12	5 829,76	12
BFLO	B22	11 507,71	3	7 963,96	5	9 024,69	2	8 188,13	3	6 216,98	13	5 198,65	9	8 916,46	6	7 116,91	6
BFLO	CNA4136	10 755,42	6	8 267,19	4	9 022,71	3	7 248,96	9	8 179,90	3	5 273,13	8	9 319,34	3	6 929,76	8
BFLO	F159	10 366,15	8	7 317,29	8	8 641,04	6	7 996,35	4	8 858,33	2	6 858,54	2	9 288,51	4	7 390,73	4
BFLO	IAC25	11 364,17	5	9 723,33	1	8 630,10	7	7 632,60	7	6 880,42	9	5 396,88	7	8 958,23	5	7 584,27	3
BFLO	N10	5 576,04	13	3 887,40	13	4 060,21	13	3 954,79	13	6 728,33	10	5 014,27	10	5 454,86	13	4 285,49	13
BFLO	N4	10 491,77	7	6 779,06	10	7 927,19	10	6 841,67	10	6 897,92	8	4 865,94	11	8 438,96	9	6 162,22	11
BFLO	N9	11 368,44	4	7 590,83	7	7 575,63	11	7 725,00	6	6 220,31	12	4 650,21	13	8 388,13	10	6 655,35	9
BFLO	PCT11	9 293,44	11	6 626,67	11	8 174,17	9	6 378,23	12	7 071,04	7	6 577,40	3	8 179,55	11	6 527,43	10
BFLO	PRIMA	10 141,77	10	7 878,96	6	8 647,50	5	7 595,73	8	7 740,73	5	6 086,46	5	8 843,33	8	7 187,05	5
BFLO	SCRID195	13 680,42	1	8 623,96	3	8 574,27	8	7 882,19	5	9 271,35	1	6 388,85	4	10 508,68	1	7 631,67	2
BFLO	SEB402	10 262,08	9	7 140,94	9	8 990,42	4	8 628,13	1	7 339,90	6	5 562,29	6	8 864,13	7	7 110,45	7
BFLO	WAB880	11 885,00	2	9 273,23	2	9 363,44	1	8 375,21	2	8 113,65	4	6 888,44	1	9 787,36	2	8 178,96	1
DTFL	126C409	76	2	73	2	89	2	89	2	87	2	89	2	84	2	83	2

DTFL	B22	80	4	78	4	95	4	91	4	91	4	93	6	89	4	87	4
DTFL	CNA4136	84	7	84	9	95	5	96	7	93	7	93	7	91	7	91	7
DTFL	F159	87	12	84	10	101	10	100	11	97	11	98	11	95	12	94	10
DTFL	IAC25	85	8	83	6	102	11	99	8	94	9	95	9	94	9	92	9
DTFL	N10	69	1	67	1	81	1	77	1	85	1	85	1	78	1	76	1
DTFL	N4	81	5	83	7	96	7	95	6	93	6	94	8	90	6	90	6
DTFL	N9	81	6	79	5	95	6	92	5	92	5	92	4	90	5	88	5
DTFL	PCT11	79	3	76	3	89	3	89	3	91	3	93	5	86	3	86	3
DTFL	PRIMA	86	10	85	12	100	8	99	9	97	12	98	12	94	10	94	11
DTFL	SCRID195	89	13	86	13	103	13	103	13	100	13	99	13	97	13	96	13
DTFL	SEB402	86	11	85	11	102	12	102	12	95	10	96	10	95	11	94	12
DTFL	WAB880	85	9	83	8	100	9	99	10	94	8	92	3	93	8	91	8
FG	126C409	84,88	8	89,68	8	80,07	10	87,42	8	67,35	13	80,58	9	77,43	12	85,89	9
FG	B22	90,30	3	91,72	6	94,44	1	93,92	3	88,16	2	91,57	2	90,97	1	92,40	2
FG	CNA4136	86,25	7	93,91	1	91,76	3	95,69	1	88,77	1	91,44	3	88,93	3	93,68	1
FG	F159	88,70	5	92,51	5	88,88	5	87,31	9	83,15	4	86,07	6	86,91	4	88,63	7
FG	IAC25	83,51	9	88,33	10	87,38	6	87,04	10	72,80	11	83,51	8	81,23	8	86,29	8
FG	N10	89,81	4	90,91	7	94,18	2	93,93	2	86,11	3	89,19	4	90,03	2	91,34	4
FG	N4	91,69	1	93,42	2	86,46	7	91,70	4	80,45	6	88,71	5	86,20	5	91,28	5
FG	N9	78,35	13	84,58	11	79,99	11	82,89	12	74,28	10	76,77	12	77,54	11	81,42	11
FG	PCT11	91,06	2	92,79	4	89,33	4	90,59	5	77,03	8	83,93	7	85,80	6	89,10	6
FG	PRIMA	80,73	12	79,41	13	78,97	12	89,29	7	76,04	9	71,73	13	78,58	10	80,14	12
FG	SCRID195	82,90	10	89,35	9	80,55	9	83,62	11	78,45	7	79,15	10	80,63	9	84,04	10
FG	SEB402	82,25	11	83,66	12	71,05	13	77,11	13	71,45	12	77,93	11	74,92	13	79,57	13
FG	WAB880	86,29	6	93,30	3	84,76	8	90,25	6	81,01	5	91,63	1	84,02	7	91,73	3
FLNC	126C409	1,74	2	1,44	2	1,70	2	1,69	2	2,12	1	1,64	1	1,85	2	1,59	2
FLNC	B22	1,40	5	1,11	10	1,40	10	1,35	12	1,51	12	1,28	12	1,43	11	1,25	11
FLNC	CNA4136	1,32	8	1,03	12	1,51	5	1,47	6	1,80	6	1,32	10	1,54	6	1,27	10
FLNC	F159	1,26	11	1,03	13	1,47	8	1,49	5	1,68	9	1,50	2	1,47	9	1,34	6
FLNC	IAC25	1,32	9	1,05	11	1,37	11	1,37	10	1,64	10	1,45	5	1,44	10	1,29	9
FLNC	N10	1,89	1	1,61	1	2,23	1	1,91	1	2,01	3	1,45	4	2,04	1	1,66	1
FLNC	N4	1,40	6	1,20	4	1,50	6	1,44	7	2,03	2	1,47	3	1,64	4	1,37	5
FLNC	N9	1,52	4	1,17	5	1,53	4	1,51	4	1,79	7	1,43	6	1,61	5	1,37	4

FLNC	PCT11	1,61	3	1,32	3	1,66	3	1,54	3	1,81	4	1,40	8	1,69	3	1,42	3
FLNC	PRIMA	1,24	13	1,16	7	1,43	9	1,40	8	1,54	11	1,35	9	1,40	12	1,30	8
FLNC	SCRID195	1,33	7	1,16	6	1,36	12	1,39	9	1,75	8	1,42	7	1,48	8	1,32	7
FLNC	SEB402	1,25	12	1,12	9	1,31	13	1,25	13	1,44	13	1,31	11	1,33	13	1,23	13
FLNC	WAB880	1,31	10	1,15	8	1,49	7	1,35	11	1,80	5	1,22	13	1,54	7	1,24	12
GNC	126C409	1,317	13	1,22	10	1,460	11	1,41	10	1,427	8	1,17	7	1,40	13	1,27	11
GNC	B22	1,555	3	1,29	4	1,535	5	1,47	6	1,527	3	1,15	8	1,54	4	1,30	4
GNC	CNA4136	1,500	7	1,24	8	1,517	10	1,44	9	1,403	10	1,29	2	1,47	7	1,32	3
GNC	F159	1,398	11	1,20	12	1,533	6	1,47	7	1,302	13	1,15	9	1,41	12	1,27	9
GNC	IAC25	1,527	5	1,21	11	1,518	9	1,49	4	1,380	11	1,13	10	1,48	6	1,27	8
GNC	N10	1,610	1	1,44	1	1,653	1	1,64	1	1,603	2	1,26	3	1,62	1	1,44	1
GNC	N4	1,427	10	1,25	7	1,518	7	1,53	3	1,450	7	1,10	11	1,47	8	1,29	5
GNC	N9	1,447	8	1,19	13	1,518	8	1,36	12	1,338	12	1,18	5	1,43	9	1,24	13
GNC	PCT11	1,543	4	1,35	2	1,562	3	1,54	2	1,605	1	1,34	1	1,57	2	1,41	2
GNC	PRIMA	1,512	6	1,29	3	1,545	4	1,44	8	1,425	9	1,08	12	1,49	5	1,27	10
GNC	SCRID195	1,382	12	1,27	5	1,442	12	1,40	11	1,453	6	1,18	6	1,43	10	1,28	7
GNC	SEB402	1,440	9	1,27	6	1,325	13	1,33	13	1,478	5	1,25	4	1,41	11	1,28	6
GNC	WAB880	1,572	2	1,23	9	1,608	2	1,48	5	1,510	4	1,07	13	1,56	3	1,26	12
GY	126C409	7 145,00	1	6 139,63	2	6 618,43	2	6 562,82	2	5 072,78	4	3 736,85	7	6 278,73	3	5 479,77	2
GY	B22	5 557,55	12	4 321,34	12	6 023,47	7	5 857,27	7	4 597,69	9	3 042,55	10	5 392,90	11	4 407,05	11
GY	CNA4136	5 503,01	13	4 606,30	11	6 264,31	4	4 718,56	13	4 863,15	5	4 506,02	3	5 543,49	8	4 610,29	10
GY	F159	5 630,37	10	4 170,23	13	5 112,78	12	5 455,00	9	4 690,37	7	2 888,75	11	5 144,51	12	4 171,33	12
GY	IAC25	6 378,06	7	5 657,36	4	5 855,88	9	4 915,69	11	4 163,66	12	4 599,54	2	5 465,86	10	5 057,53	5
GY	N10	5 619,21	11	4 709,21	10	6 134,54	6	6 507,18	3	5 617,31	3	3 767,69	6	5 790,35	4	4 994,69	6
GY	N4	7 072,55	3	5 295,88	7	6 400,37	3	6 425,14	5	5 869,12	2	4 138,33	4	6 447,35	2	5 286,45	3
GY	N9	6 493,98	6	5 244,26	8	5 725,14	10	5 634,26	8	4 655,42	8	3 546,67	8	5 624,85	6	4 808,40	9
GY	PCT11	6 005,65	8	5 470,00	5	5 959,12	8	6 449,21	4	4 757,78	6	3 800,19	5	5 574,18	7	5 239,80	4
GY	PRIMA	5 983,33	9	4 780,69	9	5 031,62	13	4 822,50	12	4 384,72	11	2 375,05	13	5 133,23	13	3 992,75	13
GY	SCRID195	7 123,66	2	6 541,81	1	5 413,89	11	5 399,54	10	3 992,31	13	2 579,12	12	5 509,95	9	4 840,15	8
GY	SEB402	6 626,81	4	5 315,19	6	6 152,92	5	5 923,19	6	4 400,42	10	3 539,54	9	5 726,71	5	4 925,97	7
GY	WAB880	6 530,60	5	5 958,66	3	6 845,88	1	6 863,47	1	6 111,81	1	4 658,70	1	6 496,10	1	5 826,94	1
HI	126C409	0,56	1	0,60	1	0,59	1	0,62	1	0,53	3	0,56	2	0,56	2	0,60	1
HI	B22	0,46	9	0,47	8	0,52	9	0,55	7	0,49	8	0,49	10	0,49	8	0,50	7

HI	CNA4136	0,45	11	0,47	11	0,53	7	0,51	11	0,50	6	0,50	8	0,49	7	0,49	9
HI	F159	0,42	13	0,44	13	0,53	8	0,53	9	0,47	10	0,46	11	0,47	10	0,48	11
HI	IAC25	0,43	12	0,47	9	0,49	10	0,50	13	0,44	12	0,51	7	0,45	11	0,49	10
HI	N10	0,55	2	0,57	2	0,58	2	0,60	2	0,58	1	0,57	1	0,57	1	0,58	2
HI	N4	0,53	3	0,53	5	0,56	4	0,58	4	0,54	2	0,54	3	0,55	3	0,55	3
HI	N9	0,51	5	0,54	3	0,53	6	0,56	6	0,51	5	0,53	5	0,51	5	0,54	5
HI	PCT11	0,51	4	0,53	4	0,57	3	0,59	3	0,50	7	0,51	6	0,52	4	0,54	6
HI	PRIMA	0,45	10	0,44	12	0,47	13	0,51	12	0,45	11	0,40	13	0,45	12	0,45	13
HI	SCRID195	0,46	8	0,49	7	0,48	11	0,51	10	0,42	13	0,41	12	0,45	13	0,47	12
HI	SEB402	0,47	7	0,47	10	0,48	12	0,53	8	0,48	9	0,50	9	0,48	9	0,50	8
HI	WAB880	0,49	6	0,53	6	0,53	5	0,57	5	0,51	4	0,54	4	0,51	6	0,55	4
LAI	126C409	5,08	7	3,27	9	3,50	9	2,58	11	3,97	10	1,96	12	4,18	9	2,60	11
LAI	B22	5,75	1	4,67	1	4,12	3	3,70	1	4,13	8	2,43	9	4,67	2	3,60	1
LAI	CNA4136	5,18	4	3,63	7	4,52	1	3,62	2	4,17	6	2,85	4	4,62	4	3,37	5
LAI	F159	4,20	12	2,78	12	3,25	11	2,83	10	4,50	5	2,68	7	3,98	11	2,77	10
LAI	IAC25	4,93	8	4,23	3	3,95	5	3,17	7	4,15	7	3,30	1	4,34	6	3,57	2
LAI	N10	3,63	13	2,40	13	1,70	13	1,57	13	2,97	13	2,06	11	2,77	13	2,01	13
LAI	N4	4,70	9	3,05	11	3,28	10	2,33	12	3,27	12	1,88	13	3,75	12	2,42	12
LAI	N9	5,43	2	3,65	6	3,88	6	3,43	4	3,38	11	2,22	10	4,23	8	3,10	8
LAI	PCT11	5,28	3	4,30	2	4,15	2	3,25	6	5,38	1	3,15	2	4,94	1	3,57	3
LAI	PRIMA	4,32	11	3,22	10	3,17	12	2,88	9	4,78	3	2,48	8	4,09	10	2,86	9
LAI	SCRID195	4,67	10	3,48	8	3,70	7	3,33	5	5,10	2	2,78	5	4,49	5	3,20	7
LAI	SEB402	5,13	6	3,75	5	3,68	8	3,58	3	4,08	9	2,78	6	4,30	7	3,37	4
LAI	WAB880	5,15	5	3,95	4	4,10	4	3,10	8	4,62	4	2,92	3	4,62	3	3,32	6
NHI	126C409	0,70	3	0,75	2	0,76	2	0,76	2	0,70	3	0,69	3	0,72	3	0,74	2
NHI	B22	0,65	9	0,65	12	0,68	9	0,71	8	0,66	6	0,63	11	0,66	7	0,66	9
NHI	CNA4136	0,64	10	0,65	11	0,68	8	0,66	13	0,65	8	0,66	7	0,66	8	0,66	11
NHI	F159	0,62	13	0,64	13	0,68	10	0,72	6	0,62	11	0,64	9	0,64	12	0,67	7
NHI	IAC25	0,62	12	0,67	7	0,70	6	0,67	12	0,61	12	0,65	8	0,64	11	0,66	10
NHI	N10	0,75	1	0,76	1	0,77	1	0,76	4	0,74	1	0,75	1	0,75	1	0,76	1
NHI	N4	0,75	2	0,71	5	0,73	5	0,77	1	0,71	2	0,70	2	0,73	2	0,73	4
NHI	N9	0,68	6	0,72	4	0,69	7	0,71	7	0,66	7	0,66	6	0,68	6	0,70	6
NHI	PCT11	0,70	4	0,70	6	0,73	4	0,75	5	0,68	4	0,67	5	0,70	4	0,71	5

NHI	PRIMA	0,68	7	0,66	9	0,65	12	0,70	10	0,62	10	0,52	13	0,65	10	0,63	13
NHI	SCRID195	0,63	11	0,67	8	0,66	11	0,70	11	0,60	13	0,57	12	0,63	13	0,65	12
NHI	SEB402	0,67	8	0,65	10	0,64	13	0,71	9	0,64	9	0,64	10	0,65	9	0,67	8
NHI	WAB880	0,70	5	0,73	3	0,73	3	0,76	3	0,67	5	0,69	4	0,70	5	0,73	3
NUE	126C409	31,86	1	45,09	2	26,20	2	40,74	2	23,51	4	38,99	7	27,19	3	41,61	2
NUE	B22	24,60	13	32,62	12	24,02	7	36,52	7	21,23	9	31,54	10	23,28	11	33,56	11
NUE	CNA4136	24,71	12	33,94	11	24,78	4	29,29	13	22,37	5	47,19	3	23,95	8	36,80	8
NUE	F159	25,05	11	30,55	13	20,27	12	33,83	9	21,68	7	30,31	11	22,33	13	31,56	12
NUE	IAC25	28,49	7	42,31	4	23,34	9	30,53	11	19,12	12	47,87	2	23,65	10	40,24	4
NUE	N10	25,05	10	35,48	10	24,46	5	40,25	3	25,98	3	39,12	6	25,16	4	38,28	6
NUE	N4	31,23	3	39,61	6	25,50	3	40,17	4	27,20	2	42,50	4	27,98	2	40,76	3
NUE	N9	28,88	6	38,28	8	22,98	10	34,79	8	21,49	8	36,25	9	24,45	6	36,44	9
NUE	PCT11	26,61	9	40,32	5	23,72	8	39,93	5	22,04	6	39,54	5	24,12	7	39,93	5
NUE	PRIMA	26,81	8	35,72	9	19,94	13	29,94	12	20,27	11	24,06	13	22,34	12	29,91	13
NUE	SCRID195	31,43	2	47,08	1	21,55	11	33,48	10	18,43	13	26,94	12	23,81	9	35,83	10
NUE	SEB402	29,26	4	38,77	7	24,40	6	36,90	6	20,34	10	37,07	8	24,67	5	37,58	7
NUE	WAB880	29,04	5	43,92	3	27,26	1	42,44	1	28,32	1	48,30	1	28,21	1	44,89	1
NUPE	126C409	0,594	8	0,73	6	0,503	9	0,75	6	0,492	5	0,66	8	0,53	10	0,71	8
NUPE	B22	0,583	11	0,65	11	0,547	3	0,76	5	0,482	6	0,58	10	0,54	7	0,66	10
NUPE	CNA4136	0,586	9	0,65	10	0,553	2	0,63	12	0,478	7	0,92	1	0,54	5	0,73	5
NUPE	F159	0,570	12	0,57	13	0,460	13	0,70	7	0,461	10	0,54	12	0,50	13	0,60	12
NUPE	IAC25	0,704	1	0,75	4	0,506	8	0,68	9	0,431	13	0,83	2	0,55	3	0,75	3
NUPE	N10	0,536	13	0,68	9	0,530	5	0,87	1	0,561	2	0,66	7	0,54	4	0,74	4
NUPE	N4	0,597	6	0,70	7	0,535	4	0,79	4	0,559	3	0,67	6	0,56	2	0,72	7
NUPE	N9	0,612	5	0,63	12	0,497	10	0,67	11	0,441	12	0,64	9	0,52	11	0,65	11
NUPE	PCT11	0,585	10	0,77	2	0,512	6	0,81	3	0,517	4	0,79	3	0,54	6	0,79	1
NUPE	PRIMA	0,595	7	0,69	8	0,477	11	0,62	13	0,469	9	0,48	13	0,51	12	0,60	13
NUPE	SCRID195	0,688	2	0,89	1	0,470	12	0,67	10	0,449	11	0,55	11	0,54	9	0,70	9
NUPE	SEB402	0,629	4	0,76	3	0,510	7	0,69	8	0,470	8	0,73	5	0,54	8	0,73	6
NUPE	WAB880	0,654	3	0,73	5	0,600	1	0,82	2	0,634	1	0,75	4	0,63	1	0,77	2
NUTE	126C409	53,91	1	62,08	1	52,34	1	54,47	1	49,64	1	59,35	4	51,96	1	58,63	2
NUTE	B22	42,36	12	50,68	13	44,31	11	48,42	10	43,79	10	55,43	8	43,49	13	51,51	9
NUTE	CNA4136	42,86	11	52,74	9	44,93	10	45,86	12	46,56	6	51,37	10	44,79	9	49,99	13

NUTE	F159	44,20	10	53,51	6	44,12	12	48,82	9	47,30	4	56,40	6	45,21	6	52,91	7
NUTE	IAC25	41,17	13	56,23	5	46,23	6	44,64	13	44,68	7	58,30	5	44,03	11	53,06	6
NUTE	N10	46,67	5	53,25	7	46,32	5	46,47	11	46,63	5	60,86	3	46,54	4	53,53	5
NUTE	N4	52,36	2	57,58	4	48,04	3	50,83	5	49,07	3	64,75	2	49,82	2	57,72	3
NUTE	N9	47,20	3	60,89	2	45,58	9	52,52	3	49,62	2	56,17	7	47,46	3	56,53	4
NUTE	PCT11	45,44	7	52,69	10	46,64	4	49,00	8	42,99	12	51,17	11	45,02	7	50,95	10
NUTE	PRIMA	44,96	8	51,79	11	41,93	13	49,03	7	43,92	9	49,18	12	43,60	12	50,00	12
NUTE	SCRID195	45,96	6	53,02	8	45,98	7	50,10	6	41,28	13	49,06	13	44,41	10	50,73	11
NUTE	SEB402	46,68	4	51,51	12	48,23	2	53,05	2	43,72	11	51,41	9	46,21	5	51,99	8
NUTE	WAB880	44,38	9	59,92	3	45,60	8	51,92	4	44,61	8	64,99	1	44,86	8	58,94	1
PANM2	126C409	418,06	1	350,93	1	323,15	1	287,50	1	333,33	1	240,74	2	358,18	1	293,06	1
PANM2	B22	297,69	9	250,46	10	243,98	12	232,87	7	250,00	10	181,48	12	263,89	10	221,60	10
PANM2	CNA4136	261,57	13	227,31	12	266,20	6	209,72	10	235,19	12	218,06	6	254,32	12	218,36	11
PANM2	F159	262,50	12	211,11	13	187,50	13	188,43	13	234,72	13	171,30	13	228,24	13	190,28	13
PANM2	IAC25	289,35	10	287,04	3	247,69	11	208,33	11	241,20	11	204,63	9	259,41	11	233,33	8
PANM2	N10	326,39	4	285,19	5	279,17	5	273,61	2	301,39	4	218,52	4	302,31	5	259,10	3
PANM2	N4	331,94	3	287,04	4	279,63	4	250,93	6	301,39	5	218,52	5	304,32	4	252,16	5
PANM2	N9	317,59	6	270,83	8	260,19	9	262,50	4	267,13	8	208,33	8	281,64	7	247,22	6
PANM2	PCT11	341,67	2	328,24	2	318,06	2	264,35	3	315,74	2	246,76	1	325,15	2	279,78	2
PANM2	PRIMA	268,98	11	234,72	11	263,43	7	203,24	12	285,65	7	197,22	10	272,69	9	211,73	12
PANM2	SCRID195	307,41	8	283,80	6	262,96	8	232,87	8	287,04	6	211,11	7	285,80	6	242,59	7
PANM2	SEB402	312,96	7	264,81	9	256,02	10	222,69	9	253,24	9	191,20	11	274,07	8	226,23	9
PANM2	WAB880	326,39	5	275,46	7	299,54	3	251,85	5	305,56	3	232,41	3	310,49	3	253,24	4
POSTFLNUP	126C409	9,581	4	10,06	6	5,361	8	8,12	6	-34,164	10	-14,45	9	-6,41	8	1,25	7
POSTFLNUP	B22	-28,524	12	-2,10	11	9,940	5	11,99	5	9,633	1	-8,57	6	-2,98	5	0,44	8
POSTFLNUP	CNA4136	-10,811	9	3,15	7	4,416	9	-3,36	10	-42,047	11	18,46	1	-16,15	11	6,08	5
POSTFLNUP	F159	-3,522	6	2,65	8	-10,268	13	-6,65	12	-48,904	12	-52,55	13	-20,90	12	-18,85	13
POSTFLNUP	IAC25	10,328	3	-0,98	10	12,061	3	4,88	7	-16,283	7	1,63	2	2,04	3	1,84	6
POSTFLNUP	N10	14,840	1	27,16	1	42,697	1	65,05	1	-16,024	6	-11,15	7	13,84	1	27,02	1
POSTFLNUP	N4	-10,495	8	13,02	5	15,432	2	27,49	3	-20,234	9	-6,77	5	-5,10	7	11,25	2
POSTFLNUP	N9	-34,815	13	-2,77	12	9,611	6	-10,89	13	-15,657	5	-5,72	4	-13,62	10	-6,46	11
POSTFLNUP	PCT11	-15,699	10	17,26	4	-5,084	12	33,89	2	-15,582	4	-18,48	10	-12,12	9	10,89	3
POSTFLNUP	PRIMA	7,675	5	2,40	9	-2,298	11	-5,80	11	-18,831	8	-33,10	11	-4,48	6	-12,17	12

POSTFLNUP	SCRID195	-25,414	11	22,64	2	1,935	10	-1,67	9	-65,505	13	-39,87	12	-29,66	13	-6,30	10
POSTFLNUP	SEB402	14,063	2	22,57	3	8,129	7	3,33	8	-3,230	2	-4,38	3	6,32	2	7,17	4
POSTFLNUP	WAB880	-7,839	7	-6,56	13	11,557	4	20,11	4	-9,591	3	-13,46	8	-1,96	4	0,03	9
SNC	126C409	0,699	3	0,59	5	0,649	12	0,72	5	0,715	9	0,67	6	0,69	10	0,66	4
SNC	B22	0,708	2	0,62	2	0,802	2	0,73	4	0,738	5	0,65	7	0,75	1	0,66	3
SNC	CNA4136	0,690	5	0,58	7	0,797	3	0,78	1	0,760	2	0,68	3	0,75	2	0,68	2
SNC	F159	0,633	11	0,52	10	0,816	1	0,65	8	0,716	8	0,55	12	0,72	5	0,57	12
SNC	IAC25	0,715	1	0,52	11	0,621	13	0,74	3	0,699	13	0,64	8	0,68	12	0,63	8
SNC	N10	0,661	8	0,59	4	0,697	9	0,77	2	0,745	4	0,54	13	0,70	7	0,63	7
SNC	N4	0,555	13	0,57	8	0,726	7	0,62	12	0,713	10	0,56	11	0,66	13	0,58	11
SNC	N9	0,696	4	0,55	9	0,776	4	0,71	7	0,724	7	0,68	4	0,73	3	0,65	5
SNC	PCT11	0,684	6	0,64	1	0,770	5	0,72	6	0,732	6	0,68	2	0,73	4	0,68	1
SNC	PRIMA	0,591	12	0,51	12	0,738	6	0,62	11	0,713	11	0,67	5	0,68	11	0,60	10
SNC	SCRID195	0,680	7	0,58	6	0,694	10	0,64	9	0,700	12	0,62	9	0,69	9	0,61	9
SNC	SEB402	0,639	10	0,60	3	0,705	8	0,62	10	0,758	3	0,71	1	0,70	8	0,64	6
SNC	WAB880	0,649	9	0,49	13	0,675	11	0,60	13	0,808	1	0,56	10	0,71	6	0,55	13
SPIPAN	126C409	76	8	70	6	104	5	99	7	91	5	78	6	90,38	5	82,38	6
SPIPAN	B22	57	13	50	13	78	11	78	12	62	13	56	13	65,66	13	61,40	13
SPIPAN	CNA4136	68	10	59	12	77	13	73	13	74	11	72	8	73,16	11	67,67	12
SPIPAN	F159	66	12	60	10	98	6	106	5	84	8	68	11	82,63	8	78,03	8
SPIPAN	IAC25	70	9	60	9	85	10	88	11	80	9	85	3	78,58	10	77,45	9
SPIPAN	N10	80	6	68	7	94	8	94	10	85	7	77	7	86,43	7	79,71	7
SPIPAN	N4	78	7	67	8	105	4	111	3	96	2	82	4	93,26	4	86,68	5
SPIPAN	N9	91	3	80	3	106	3	101	6	93	4	87	2	96,42	3	89,59	3
SPIPAN	PCT11	66	11	60	11	78	12	98	8	74	10	69	10	72,69	12	75,62	11
SPIPAN	PRIMA	111	1	100	1	112	2	118	2	93	3	71	9	105,56	2	96,09	2
SPIPAN	SCRID195	87	4	75	4	92	9	96	9	68	12	58	12	82,56	9	76,34	10
SPIPAN	SEB402	92	2	82	2	133	1	131	1	97	1	97	1	107,18	1	103,16	1
SPIPAN	WAB880	80	5	74	5	98	7	109	4	91	6	79	5	89,63	6	87,31	4
SY	126C409	5 619,58	12	4 022,41	12	4 604,86	11	3 969,72	13	4 413,56	12	2 907,78	12	4 879,34	12	3 633,30	12
SY	B22	6 566,34	8	4 817,92	9	5 480,32	7	4 879,72	6	4 793,29	9	3 102,04	11	5 613,32	8	4 266,56	9
SY	CNA4136	6 840,09	7	5 227,87	7	5 592,22	6	4 455,79	10	4 801,99	8	4 448,19	2	5 744,77	7	4 710,62	5
SY	F159	7 777,04	3	5 294,81	6	4 621,02	10	4 912,59	5	5 446,44	3	3 335,88	8	5 948,16	6	4 514,43	7



SY	IAC25	8 476,57	1	6 357,13	2	6 118,98	2	4 951,39	4	5 143,75	5	4 465,05	1	6 579,77	1	5 257,85	1
SY	N10	4 577,18	13	3 534,95	13	4 469,72	13	4 380,23	12	4 142,08	13	2 846,94	13	4 396,33	13	3 587,38	13
SY	N4	6 166,16	10	4 741,20	10	5 037,92	9	4 626,25	8	4 901,76	6	3 426,30	7	5 368,61	9	4 264,58	10
SY	N9	6 291,11	9	4 400,00	11	5 085,42	8	4 390,93	11	4 495,42	11	3 151,67	10	5 290,65	10	3 980,86	11
SY	PCT11	5 783,56	11	4 884,72	8	4 564,26	12	4 528,06	9	4 835,74	7	3 600,05	4	5 061,19	11	4 337,61	8
SY	PRIMA	7 316,30	5	6 108,38	3	5 758,19	5	4 671,71	7	5 409,35	4	3 335,23	9	6 161,28	5	4 705,11	6
SY	SCRID195	8 351,81	2	6 795,56	1	5 780,23	4	5 094,49	3	5 606,30	2	3 595,69	5	6 579,44	2	5 161,91	2
SY	SEB402	7 326,62	4	5 837,41	4	6 575,46	1	5 309,31	1	4 787,08	10	3 592,87	6	6 229,72	3	4 913,19	3
SY	WAB880	6 929,54	6	5 339,77	5	5 973,52	3	5 205,42	2	5 741,39	1	3 966,34	3	6 214,81	4	4 837,18	4
TGW	126C409	26,93	11	27,63	11	25,00	11	26,68	9	25,05	12	25,58	9	25,66	11	26,63	11
TGW	B22	36,37	3	38,07	1	34,10	1	34,51	1	32,93	1	32,47	1	34,46	1	35,01	1
TGW	CNA4136	36,00	4	37,43	3	33,15	2	32,74	2	31,37	2	31,92	3	33,51	3	34,03	2
TGW	F159	37,71	2	36,76	4	32,13	3	31,81	3	28,99	4	29,57	4	32,94	4	32,71	4
TGW	IAC25	38,63	1	37,73	2	31,86	4	31,61	4	30,18	3	32,01	2	33,56	2	33,78	3
TGW	N10	24,28	13	26,80	12	24,95	12	26,93	8	25,62	8	24,96	12	24,95	12	26,23	12
TGW	N4	30,07	6	29,43	8	25,62	10	25,26	12	25,57	9	26,24	8	27,08	8	26,98	8
TGW	N9	28,77	9	28,68	10	26,63	8	26,43	10	25,14	11	25,56	10	26,85	9	26,89	9
TGW	PCT11	29,43	7	30,25	7	27,12	7	27,51	7	26,77	6	27,08	6	27,77	7	28,28	7
TGW	PRIMA	24,89	12	26,68	13	22,86	13	22,88	13	22,00	13	23,38	13	23,25	13	24,31	13
TGW	SCRID195	32,06	5	34,22	5	28,33	5	28,91	5	26,18	7	26,44	7	28,86	5	29,86	5
TGW	SEB402	27,98	10	28,83	9	25,77	9	26,41	11	25,30	10	25,17	11	26,35	10	26,80	10
TGW	WAB880	29,15	8	31,47	6	27,82	6	27,84	6	27,46	5	27,83	5	28,14	6	29,04	6
TNUP	126C409	133,80	7	100,35	5	126,93	9	120,49	6	105,79	5	63,04	8	122,18	10	94,63	8
TNUP	B22	132,17	9	85,15	12	137,01	3	121,55	5	104,58	6	56,52	10	124,59	6	87,74	10
TNUP	CNA4136	131,02	11	88,19	10	139,69	2	101,73	12	103,58	7	87,78	1	124,76	5	92,56	9
TNUP	F159	128,31	12	77,89	13	116,08	13	111,97	7	99,82	10	51,74	12	114,74	13	80,53	12
TNUP	IAC25	159,56	1	102,20	4	126,96	8	109,60	9	93,78	13	79,08	2	126,77	3	96,96	4
TNUP	N10	120,68	13	89,47	9	132,85	5	140,96	1	121,18	2	63,95	7	124,90	4	98,13	3
TNUP	N4	135,55	6	94,48	7	134,02	4	126,69	4	120,32	3	65,07	6	129,96	2	95,42	5
TNUP	N9	138,41	5	87,02	11	124,36	10	107,77	11	95,57	12	62,20	9	119,45	11	85,66	11
TNUP	PCT11	132,13	10	106,08	2	128,65	6	131,27	3	111,40	4	75,40	3	124,06	8	104,25	1
TNUP	PRIMA	133,39	8	93,47	8	120,65	11	100,28	13	101,23	9	46,93	13	118,42	12	80,23	13
TNUP	SCRID195	155,92	2	124,57	1	118,11	12	108,00	10	97,39	11	52,44	11	123,81	9	95,01	6

TNUP	SEB402	143,45	4	103,31	3	128,07	7	111,44	8	101,63	8	69,31	5	124,38	7	94,69	7
TNUP	WAB880	147,43	3	100,04	6	150,72	1	133,40	2	136,99	1	71,88	4	145,05	1	101,78	2

PRIMA : PRIMAVERA

SEB402 : SEBOTA402

## b) Valeur de la corrélation de Pearson entre NUE, NUPE, NUTE, GY et les autres caractères

Caractères	NUE						NUPE						NUTE						GY					
	2013-HN	2013-LN	2014-HN	2014-LN	2015-HN	2015-LN	2013-HN	2013-LN	2014-HN	2014-LN	2015-HN	2015-LN	2013-HN	2013-LN	2014-HN	2014-LN	2015-HN	2015-LN	2013-HN	2013-LN	2014-HN	2014-LN	2015-HN	2015-LN
BFL	0,19	0,24	-0,11	-0,32	-0,18	-0,21	<b>0,69</b>	0,22	0,07	<b>-0,56</b>	-0,04	-0,15	-0,43	0,05	-0,28	0,30	-0,41	-0,23	0,21	0,25	-0,10	-0,33	-0,18	-0,22
DTFL	0,18	0,06	-0,36	-0,48	-0,51	-0,46	<b>0,63</b>	0,18	-0,24	<b>-0,65</b>	-0,39	-0,31	-0,38	-0,19	-0,30	0,12	-0,49	-0,53	0,18	0,10	-0,36	-0,48	-0,52	-0,46
FG	-0,33	-0,03	0,11	0,07	0,28	<b>0,57</b>	-0,49	-0,11	0,35	0,37	0,30	0,44	0,06	0,09	-0,28	-0,55	-0,11	0,54	-0,31	-0,04	0,10	0,07	0,29	<b>0,56</b>
FLNC	0,00	0,22	0,26	0,34	<b>0,63</b>	-0,09	-0,49	0,14	0,16	0,49	0,46	-0,19	0,46	0,21	0,22	-0,11	<b>0,61</b>	0,18	0,00	0,19	0,25	0,35	<b>0,63</b>	-0,09
FLNUP	0,29	<b>0,66</b>	0,15	-0,25	0,32	-0,27	<b>0,59</b>	0,54	0,31	<b>-0,56</b>	0,32	-0,25	-0,22	0,33	-0,15	0,47	0,08	-0,16	0,31	<b>0,66</b>	0,16	-0,25	0,32	-0,29
GNC	<b>-0,63</b>	-0,14	0,08	0,34	0,35	0,14	-0,16	0,17	0,37	<b>0,71</b>	<b>0,58</b>	0,47	<b>-0,60</b>	-0,51	-0,39	<b>-0,56</b>	-0,43	-0,43	<b>-0,62</b>	-0,17	0,06	0,34	0,34	0,12
GY	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,56</b>	<b>0,84</b>	<b>0,82</b>	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>	<b>0,88</b>	<b>0,66</b>	0,50	<b>0,63</b>	0,52	0,46	<b>0,58</b>	1	1	1	1	1	1
HI	0,39	0,47	<b>0,58</b>	<b>0,88</b>	<b>0,82</b>	<b>0,73</b>	-0,38	0,14	0,33	<b>0,77</b>	<b>0,65</b>	0,51	<b>0,80</b>	<b>0,67</b>	<b>0,56</b>	0,48	0,65	<b>0,74</b>	0,39	0,44	<b>0,58</b>	<b>0,88</b>	<b>0,82</b>	<b>0,73</b>
LAI	0,13	0,17	0,17	-0,43	-0,43	0,22	0,28	0,24	0,25	<b>-0,57</b>	-0,15	0,45	-0,11	-0,10	-0,05	0,07	-0,72	-0,39	0,14	0,16	0,17	-0,43	-0,43	0,20
NHI	0,22	0,45	<b>0,63</b>	<b>0,93</b>	<b>0,75</b>	<b>0,68</b>	-0,46	0,11	0,41	<b>0,83</b>	<b>0,65</b>	0,48	<b>0,66</b>	<b>0,68</b>	0,54	0,51	0,47	<b>0,72</b>	0,22	0,42	<b>0,63</b>	<b>0,93</b>	<b>0,75</b>	<b>0,68</b>
NUPE	<b>0,56</b>	<b>0,84</b>	<b>0,83</b>	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>	<b>0,89</b>	1	1	1	1	1	1	-0,24	-0,03	0,08	0,08	0,09	0,14	<b>0,56</b>	<b>0,84</b>	<b>0,82</b>	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>	<b>0,88</b>
NUTE	<b>0,67</b>	0,51	<b>0,63</b>	0,53	0,46	<b>0,57</b>	-0,24	-0,03	0,08	0,08	0,09	0,14	1	1	1	1	1	1	<b>0,66</b>	0,50	<b>0,63</b>	0,52	0,46	<b>0,58</b>
PANM2	<b>0,61</b>	<b>0,73</b>	<b>0,64</b>	<b>0,78</b>	0,50	0,51	-0,06	0,54	0,42	<b>0,67</b>	<b>0,57</b>	0,47	<b>0,77</b>	0,49	<b>0,56</b>	0,47	0,12	0,25	<b>0,60</b>	<b>0,70</b>	<b>0,65</b>	<b>0,79</b>	0,49	0,52
POST-FLNUP	0,01	0,20	0,47	<b>0,67</b>	0,24	<b>0,74</b>	-0,08	0,48	0,44	<b>0,90</b>	0,29	<b>0,79</b>	0,13	-0,33	0,20	-0,20	-0,03	0,20	-0,01	0,21	0,45	<b>0,67</b>	0,24	<b>0,74</b>
SIPAN	0,36	0,24	-0,05	0,27	0,39	0,48	0,17	0,22	-0,25	0,02	0,25	0,38	0,24	0,12	0,23	<b>0,60</b>	0,52	0,32	0,35	0,25	-0,05	0,26	0,39	0,49
SNC	-0,16	-0,03	-0,38	-0,17	<b>0,57</b>	-0,11	0,22	0,21	-0,10	0,06	<b>0,68</b>	0,22	-0,36	-0,36	-0,53	-0,52	-0,09	<b>-0,67</b>	-0,17	-0,03	-0,38	-0,16	<b>0,57</b>	-0,11
SY	0,14	0,26	0,01	-0,13	-0,15	<b>0,56</b>	<b>0,74</b>	0,51	0,18	-0,12	0,04	<b>0,70</b>	-0,50	-0,36	-0,21	-0,05	-0,52	-0,12	0,14	0,28	0,02	-0,13	-0,15	<b>0,55</b>
TNUP	<b>0,57</b>	<b>0,86</b>	<b>0,82</b>	<b>0,88</b>	<b>0,92</b>	<b>0,90</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	-0,22	0,01	0,07	0,08	0,08	0,15	<b>0,57</b>	<b>0,87</b>	<b>0,82</b>	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>	<b>0,89</b>
TGW	-0,29	-0,24	-0,05	-0,30	-0,10	0,37	0,30	-0,13	0,16	-0,11	-0,11	0,44	<b>-0,58</b>	-0,30	-0,30	-0,51	-0,13	0,04	-0,28	-0,23	-0,05	-0,30	-0,09	0,35

Les valeurs présentées en gras sont significatives au seuil de 5%

## Annexe 3 : Liste des 198 variétés utilisées dans les essais

Géotype	Pays	Centre de recherche	Numéro
I26-C409-8-1-2	Colombie	CIAT	1
B 22	Brésil	EMBRAPA	2
C 537B	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	3
C507 1373-1-b-2- -	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	4
C630 139-46-2-3-3-b-1-1-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	5
C630 38-4-1-b-3-2-1-b-b	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	6
CAIAPO	Brésil		8
CHA LOY OE	Thailand		9
CHHOMRONG DHAN	Nepal		10
CIRAD 141	Brésil	CIRAD	11
CIRAD 392	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	12
CIRAD 394	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	13
CIRAD 409	Brésil	CIRAD	15
CIRAD 447	Brésil	CIRAD	16
CIRAD 488	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	17
CNA 4123	Brésil	EMBRAPA	18
CNA 4136	Brésil	EMBRAPA	19
CNA 4137	Brésil	EMBRAPA	20
CNA 4196	Brésil	EMBRAPA	21
CNA-IREM 190	Brésil	EMBRAPA	22
CT13582-15-5-M	Colombie	CIAT	23
CUIABANA	Brésil		24
CURINCA	Brésil		25
DANGREY	Bhutan		26
DANIELA	Brésil		27
DOURADO PRECOCE	Brésil		28
EARLY MUTANT IAC 165	Brésil		29
ESTRELA	Brésil		31
EXP 003	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	32
EXP 006	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	33
EXP 011	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	34
EXP 013	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	35
EXP 202	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	36
EXP 206	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	37
EXP 302	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	38
EXP 303	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	39
EXP 304	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	40
EXP 401	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	41
EXP 409	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	42
EXP 910	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	43
F152,06,33,53 13-1-5-1-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	44

F154,3G,04,12,10 1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	46
FOFIFA 116	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	47
FOFIFA 151	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	48
FOFIFA 159	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	49
FOFIFA 167	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	50
FOFIFA 168	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	51
FOFIFA 171	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	52
FOFIFA 172	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	53
FOFIFA 173	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	54
FOFIFA 180	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	55
FOFIFA 181	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	56
FOFIFA 62	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	57
GUARANI	Brésil		58
HD 1-4	France	CIRAD	59
IAC 1205	Brésil	IAC	60
IAC 25	Brésil	IAC	61
IR53236-275-1	Philippines	IRRI	62
IR66421-105-1-1	Philippines	IRRI	63
IRAT 109	Brésil	CIRAD	64
IRAT 112	Brésil	CIRAD	65
IRAT 13	Brésil	CIRAD	66
IRAT 134	Brésil	CIRAD	67
IRAT 212	Brésil	CIRAD	68
IRAT 234	Brésil	CIRAD	69
IRAT 265	Brésil	CIRAD	70
IRAT 367	Brésil	CIRAD	71
IRAT 380	Brésil	CIRAD	72
IREM 239	Brésil		73
KUROKA	Japan		74
LULUWINI 22M	Brésil		75
MUNUMLIGUERO	Brésil		76
NABESHI	Taiwan		77
NERICA 1	Ivory Coast	AFRICARICE	78
NERICA 10	Ivory Coast	AFRICARICE	79
NERICA 11	Ivory Coast	AFRICARICE	80
NERICA 12	Ivory Coast	AFRICARICE	81
NERICA 13	Ivory Coast	AFRICARICE	82
NERICA 16	Ivory Coast	AFRICARICE	83
NERICA 18	Ivory Coast	AFRICARICE	84
NERICA 2	Ivory Coast	AFRICARICE	85
NERICA 3	Ivory Coast	AFRICARICE	86
NERICA 4	Ivory Coast	AFRICARICE	197
NERICA 5	Ivory Coast	AFRICARICE	87
NERICA 6	Ivory Coast	AFRICARICE	88

NERICA 7	Ivory Coast	AFRICARICE	89
NERICA 8	Ivory Coast	AFRICARICE	90
NERICA 9	Ivory Coast	AFRICARICE	91
PCT11 MAD2007\0\0 14-1-1-1-3-3-2	Colombie	CIAT	92
PCT11 MAD2007\0\0 28-3-3-5-5-5	Colombie	CIAT	93
PCT11 MAD2007\0\0 3-3-1-3-2-2-4	Colombie	CIAT	94
PCT11 MAD2007\0\0 3-5-5-2-1-4-4	Colombie	CIAT	95
PCT11 MAD2007\0\0 50-1-1-1-5-5-5	Colombie	CIAT	96
PCT11 x CNA7 42-3-2	Colombie	CIAT	97
PCT11 x CNA7 73-2-5	Colombie	CIAT	98
PCT11\0\0\2\Bo\2\1>181	Colombie	CIAT	99
PCT-4 Mad2007\0\1 18-2--1-5-2-3	Colombie	CIAT	100
PCT-4\0\0\1>5-M-1-6	Colombie	CIAT	101
PCT-4\SA\1\1\SA\2\1>746-1-5-4-1 5-5-1-1-1	Colombie	CIAT	102
PCT-4\SA\1\1>975-M-2-M-3 2-5-5-1-1	Colombie	CIAT	103
PCT-4\SA\4\1>1076-2-4-1-5	Colombie	CIAT	104
PCT-4\SA\4\1>330-1-4-5-1-M 1-1-1-1-2	Colombie	CIAT	105
PCT-4\SA\4\1>330-2-2-3-2-M 5-4-4-3-1-5	Colombie	CIAT	106
PCT-5\PHB\1\0,PHB\1,PHB\1,PHB\1>78-2--6-2-M	Colombie	CIAT	107
PRIMAVERA	Brésil	IAC	108
SCRID036 4-1-1-5-M	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	109
SCRID090 148-1-2-4-5-4-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	110
SCRID090 60-1-1-2-4-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	111
SCRID090 72-3-1-3-5-1--	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	112
SCRID090 89-1-5-4-2-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	113
SCRID091 10-1-3-2-5-3-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	114
SCRID091 11-1-4-3-2-4-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	115
SCRID091 15-2-2-1-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	116
SCRID091 24-3-2-2-3-5-4	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	117
SCRID111 1-4-3-3-5-5-4	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	118
SCRID128 1-3-4-2-4-4	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	119
SCRID128 18-5-4-4-5-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	120
SCRID128 21-3-1-1-1-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	122
SCRID136 20-1-1-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	123
SCRID139 18-2-4-1-1-3-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	124
SCRID139 9-1-5-2-4-4-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	125
SCRID195 11-4-4-2-4-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	127
SCRID195 67-1-1-2-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	129
SCRID195 A1-3-4-2-4-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	130
SCRID195-1-5-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	131
SCRID200 15-4-2-4-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	132
SCRID222 122-4-3-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	133
SCRID222 134-1-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	134
SCRID222 164-1-1-4	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	135

SCRID241 1-1-1-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	136
SCRID242 22-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	137
SCRID243 52-1-1-4	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	138
SCRID251 25-2-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	139
SCRID251 95-1-1-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	140
SCRID252 18-1-2-4	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	141
SCRID253 5-2-2-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	142
SCRID254 85-3-2-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	143
SCRID260 19-2-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	144
SCRID264 69-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	145
SCRID271 12-1-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	146
SCRID271 37-1-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	147
SCRID271 67-3-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	148
SCRID273 17-1-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	149
SCRID273 25-1-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	150
SCRID274 30-1-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	151
SCRID275 13-1-5	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	152
SCRID275 72-5-5	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	153
SCRID278 148-5-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	154
SCRID278 151-5-1	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	155
SCRID278 42-2-3	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	156
SCRID292 116-4-2	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	157
SCRID292 24-2-5	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	158
SCRID6 4-3-M	Madagascar	FOFIFA-CIRAD	159
SEBOTA 239	Brésil	CIRAD	160
SEBOTA 33	Brésil	CIRAD	161
SEBOTA 330	Brésil	CIRAD	162
SEBOTA 400	Brésil	CIRAD	164
SEBOTA 401	Brésil	CIRAD	165
SEBOTA 402	Brésil	CIRAD	166
SEBOTA 403	Brésil	CIRAD	167
SEBOTA 404	Brésil	CIRAD	168
SEBOTA 405	Brésil	CIRAD	169
SEBOTA 406	Brésil	CIRAD	170
SEBOTA 408	Brésil	CIRAD	172
SEBOTA 409	Brésil	CIRAD	173
SEBOTA 410	Brésil	CIRAD	174
SEBOTA 65	Brésil	CIRAD	175
SEBOTA 70	Brésil	CIRAD	176
SEBOTA€ 337	Brésil	CIRAD	163
SUCUPIRA	Brésil		177
TRES MESES	Brésil		178
WAB 450-11-1-P28-1-HB	Ivory Coast	AFRICARICE	179
WAB 450-25-2-9-4-1-B-HB	Ivory Coast	AFRICARICE	180

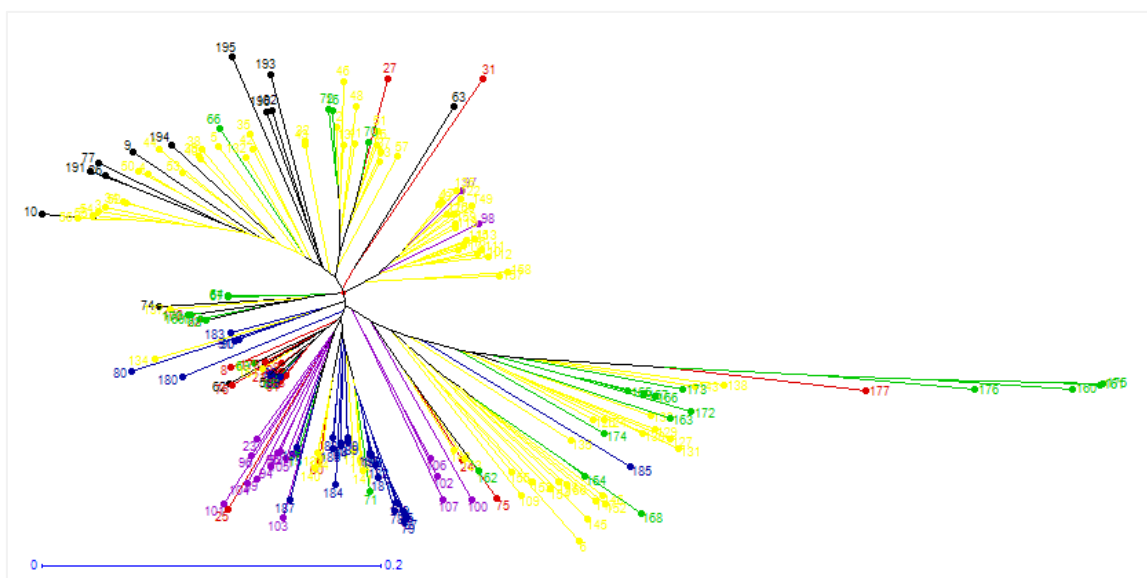
WAB 56-125	Ivory Coast	AFRICARICE	181
WAB 56-50	Ivory Coast	AFRICARICE	182
WAB 706-3-4-K4-KB-1	Ivory Coast	AFRICARICE	183
Wab 758 1-1-HB-4	Ivory Coast	AFRICARICE	184
WAB 759-54-2-3-HB-2B	Ivory Coast	AFRICARICE	185
WAB 775-95-2-2-HB-1/CIRAD 409-3 1-2-5-3-1	Ivory Coast	AFRICARICE	186
WAB 788-18-2-2-HB-2/PCT-4\SA\1 \1>721-M-2-M-4-M-2-M-5-M-1	Ivory Coast	AFRICARICE	187
WAB 878-6-12-1-1-P1-HB	Ivory Coast	AFRICARICE	188
WAB 880-1-32-1-1-P2-HB-1 1-2-2	Ivory Coast	AFRICARICE	198
WAB 891SG26	Ivory Coast	AFRICARICE	189
WAB 891SG9	Ivory Coast	AFRICARICE	190
YANGKUM RED	Bhutan		191
YUNLU 48		YAAS	196
YUNLU 50		YAAS	195
YUNLU 64		YAAS	192
YUNLU 65		YAAS	193
YUNLU 7		YAAS	194



**Annexe 4 : Valeur de la distribution phénotypique des caractères étudiés par niveau d'azote et par année**

Traits	2015						2016						Unité
	HN			LN			HN			LN			
	Min	Moy	Max	Min	Moy	Max	Min	Moy	Max	Min	Moy	Max	
DTFL	80,00	96,05	110,50	81,50	96,68	110,00	71,50	90,44	112,00	71,50	89,45	108,00	j
FG	31,77	72,52	93,51	43,28	82,05	97,75	36,74	85,80	97,68	59,32	90,19	98,06	%
GNC	1,34	1,71	2,27	0,91	1,29	1,73	1,40	1,80	2,18	1,04	1,42	1,86	%
GY	1216,04	4051,13	6526,46	780,42	3193,85	6255,42	1327,71	5348,68	8246,04	1997,50	3993,69	6498,75	kg/ha
HI	0,19	0,44	0,58	0,24	0,48	0,62	0,18	0,45	0,57	0,27	0,49	0,63	-
NHI	0,29	0,65	0,83	0,41	0,69	0,83	0,37	0,67	0,86	0,58	0,75	0,90	-
NUE	5,57	18,58	31,04	8,48	32,52	57,08	5,27	22,33	33,95	14,00	33,49	54,78	kg grain/kgN
NUPE	0,25	0,48	0,75	0,28	0,60	1,00	0,27	0,58	0,86	0,23	0,63	0,94	kgN/kgN
NUTE	19,55	38,48	51,59	28,37	54,25	75,27	18,71	37,96	49,16	33,56	53,96	74,92	kg grain/kgN
PANM2	147,92	291,30	564,58	75,00	214,27	416,67	220,83	329,26	497,92	141,67	252,00	445,83	-
PH	63,00	108,57	158,92	53,33	92,59	131,08	67,67	112,17	156,58	62,00	96,65	141,67	cm
SNC	0,36	0,70	0,97	0,35	0,54	0,94	0,37	0,69	1,05	0,15	0,46	0,72	%
SPIPAN	28,19	74,89	165,03	29,74	67,27	172,51	29,78	68,62	112,95	30,60	63,38	129,33	-
SY	3237,08	5161,43	7632,71	1413,13	3326,83	6215,42	3759,58	6553,30	10678,75	2480,21	4151,56	7509,58	kg/ha
TGW	15,93	27,22	40,00	16,98	28,25	43,35	17,05	28,73	43,70	17,65	28,72	41,15	g
TNUP	56,55	105,55	164,28	24,73	59,29	106,80	67,69	140,64	211,67	32,54	76,05	125,72	kg/ha

## Annexe 5 : Représentation de la structure génotypique du panel de 190 variétés étudiées



Structure génotypique des 190 variétés utilisées dans cette étude, basée sur la méthode d'agrégation (Neighbour-joining tree) utilisant 38390 SNPs avec les origines des variétés. Blue: Africarice (Ivory Coast), red: Embrapa (Brazil), violet: CIAT (Colombia), green: Cirad (Brazil), yellow: Fofifa/Cirad (Madagascar), black: other (Nepal, inco, YAAS, Japan, Buthan)

## Annexe 6: Article publié et traduit en français au chapitre II

Field Crops Research 213 (2017) 194–203



Contents lists available at ScienceDirect

Field Crops Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fcr](http://www.elsevier.com/locate/fcr)

## Genetic variability of nitrogen use efficiency in rainfed upland rice



Tatiana Rakotoson<sup>a</sup>, Julie Dusserre<sup>b</sup>, Philippe Letourmy<sup>b</sup>, Isabelle Ratsimiala Ramonta<sup>c</sup>,  
 Tuong-Vi Cao<sup>d</sup>, Alain Ramanantsoanirina<sup>a</sup>, Pierre Roumet<sup>c</sup>, Nourollah Ahmadi<sup>d</sup>,  
 Louis-Marie Raboin<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> FOFIFA, SRR Antsirabe, BP 230, Antsirabe 110, Madagascar<sup>b</sup> CIRAD, UPR AIDA, TA B-115/02, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France<sup>c</sup> Université d'Antananarivo, Faculté des sciences, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar<sup>d</sup> CIRAD, UMR AGAP, TA A-108/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France<sup>e</sup> INRA, UMR AGAP, Campus Supagro Montpellier, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Upland rice

Low input

Nitrogen uptake efficiency

Nitrogen utilization efficiency

## ABSTRACT

In sub-Saharan Africa and in Madagascar, upland rice is mostly grown for subsistence by resource-poor farmers in low-input production systems with low yields. In this context, soil nitrogen availability is a major limiting factor. To determine the appropriate breeding strategy to improve nitrogen use efficiency (NUE), the genetic variability and the level of  $G \times N$  interaction of NUE need to be evaluated. NUE and its components are complex quantitative traits and the study of their relationship with other simpler traits should help understand the mechanisms involved in NUE and identify ways to improve it. A study was conducted at mid-altitude in Madagascar using 13 adapted tropical japonica rice varieties over three cropping seasons with two contrasted levels of applied N (high N with 90–120 kg N ha<sup>-1</sup> as urea and low N without mineral fertilizer) in rainfed upland conditions. Year  $\times$  N and Year  $\times$  G interactions were significant due to contrasted rainfall distributions across the three cropping seasons. Agronomic efficiencies of N fertilization were low (11.5 kg grain kg<sup>-1</sup> N in the best year) because of N loss through leaching or volatilization. Our results also suggest gaseous loss of N by plants between flowering and harvest, particularly under the high N treatment. The experiment revealed significant genetic variability for NUE, nitrogen uptake efficiency (NUPE) and nitrogen utilization efficiency (NUTE) in both high N and low N treatments but a low level of  $G \times N$  interaction. The variation in NUPE accounted for more of the variation in NUE than the variation in NUTE. There was no correlation between NUPE and NUTE, either under high N or under low N. We found no negative relationship between grain yield and grain N concentration under low N. The relationship between NUE and agronomic and N-related traits differed from one year to the next, illustrating the plasticity of the contribution of the different agronomic traits to NUE as a function of the contrasted climatic conditions (particularly the rainfall distribution pattern). However, two traits, the number of panicles per m<sup>2</sup> and the harvest index were consistently positively correlated with NUE. The difference between total N uptake at flowering and at harvest was positively correlated with NUE, particularly under the low N treatment.

## 1. Introduction

Demand for rice is increasing in sub-Saharan Africa (SSA) where rainfed upland rice accounts for 38% of rice cultivated areas. However, yields of upland rice are very low, ranging from 1 to 2 t ha<sup>-1</sup> (Balasubramanian et al., 2007). In SSA, upland rice is mostly grown for subsistence by resource-poor farmers in low-input production systems on poor soils (Saito and Futakuchi, 2009). In Madagascar, where upland rice cultivation is expanding in the highlands (Raboin et al., 2014), the situation is similar. Use of mineral fertilizer is uniformly very low

because of its high cost (Minten et al., 2007) and animal manure is the only source of fertilizer (Alvarez et al., 2014). In such economic and environmental contexts that have been left aside by the “green revolution”, adapting crops to low inputs may be possible through breeding programs that specifically target low-input environments (Atlin and Frey, 1989; Ceccarelli, 1996). Soil nitrogen availability is a major limiting factor in low-input farming systems with limited access to mineral N and hence greater reliance on sources of organic inputs and their mineralization (Dawson et al., 2008). Nitrogen is the most important mineral nutrient for plant development and nitrogen use

\* Corresponding author.

E-mail address: [louis-marie.raboin@cirad.fr](mailto:louis-marie.raboin@cirad.fr) (L.-M. Raboin).<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2017.07.023>Received 5 May 2017; Received in revised form 30 July 2017; Accepted 31 July 2017  
0378-4290/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

efficiency (NUE) may play a central role in low-input systems. For a given fertilization level, improving NUE should positively impact rice production both qualitatively and quantitatively. The genetic variability available for nitrogen use efficiency in breeders' germplasm, the level of genotype  $\times$  N input interaction as well as the accuracy of selection with different levels of N inputs need to be evaluated to identify appropriate breeding strategies (Garnett et al., 2015).

Nitrogen use efficiency (NUE) is usually defined as grain yield per unit of N supplied by the soil and by fertilizer (Moll et al., 1982). NUE is the product of N uptake efficiency (NUPE; crop N uptake per unit of N supply) and N utilization efficiency (NUTE; grain yield per unit of N uptake). NUE and its components are complex quantitative traits and the study of their relationship with other simpler morphological or physiological traits could help understand the mechanisms involved in NUE and identify ways to improve selection efficiency. Genetic variability of both N uptake efficiency and N utilization efficiency has been demonstrated in a large number of crops (Hirel et al., 2007). Interactions between genotype and N may exist (Le Gouis et al., 2000; Gallais and Coque, 2005; Ju et al., 2015). The genetic variability of traits related to NUE and its components (NUPE and NUTE) thus needs to be investigated under both low and high nitrogen levels.

Many studies on rice have revealed a significant genetic variability for NUE mostly in irrigated rice or rainfed lowland rice (De Datta and Broadbent 1988, 1990, 1993; Tirol-padre et al., 1996; Singh et al., 1998; Inthapanya et al., 2000; Koutroubas and Ntanos, 2003; Haefele et al., 2008; Wu et al., 2016). A negative correlation between NUTE and grain and straw N concentrations has been reported (Tirol-padre et al., 1996; Inthapanya et al., 2000; Koutroubas and Ntanos, 2003; Wu et al., 2016). Indica varieties were shown to have higher NUTE than japonica varieties due to both a higher harvest index and a higher nitrogen harvest index (Koutroubas and Ntanos, 2003). Grain yields of rice under high and low nitrogen supplies have been shown to be significantly correlated (De Datta and Broadbent, 1990; Singh et al., 1998; Haefele et al., 2008) although the correlation was looser in rainfed lowland than in irrigated conditions (Haefele et al., 2008). In contrast, Ju et al. (2015) reported a significant genotype  $\times$  nitrogen supply level interaction for grain yield and N uptake in irrigated conditions. They linked the high NUE of two lowland japonica varieties with greater root biomass, deeper root distribution, longer root length, greater root oxidation activity. Pan et al.

(2016) also found significant positive correlations between total nitrogen accumulation and total root length, root superficial area, and root volume. Nitrogen remobilization has been shown to play a central role in NUE in rice, as it accounts for 70–90% of the total panicle N (Mae, 1997; Tabuchi et al., 2007). De Datta and Broadbent (1993) found that remobilization, measured as changes in the ratio of leaf weight to total biomass or the percentage loss of leaf N between the maximum accumulation of leaf N and harvest, was linked to NUE. Wu et al. (2016) dissociated concentration of N in the straw between leaf N concentration and stem N concentration, thereby revealing distinct relationships with NUTE: improvements in NUTE were associated with lower leaf N concentration when NUTE was  $< 50 \text{ kg kg}^{-1}$ , while further improvements in NUTE were associated with a decrease in stem N concentration. As a way to improve NUTE, these authors thus proposed to increase N translocation from the stems instead of leaves, to delay leaf senescence during the grain filling period.

Upland rice is often cultivated with no supply of inorganic N despite low soil fertility, but little is known about rice NUE in this ecosystem. So far, only data from greenhouse experiments are available (Zaharah and Hanafi, 2009, 2014; Fageria et al., 2010) which showed significant differences in total N uptake between upland rice varieties. The total N uptake at maturity of six upland rice landraces was correlated with their root length 14 days after sowing (Zaharah and Hanafi, 2009). The purpose of the present study was thus to analyze (i) the extent of genotypic variability of NUE in the tropical japonica germplasm used in rainfed upland conditions; (ii) the relationships between NUE components and some other agronomic traits in order to identify proxy target traits for NUE improvement with a particular focus on low N conditions. The study was conducted at mid-altitude in Madagascar using 13 upland rice varieties over three cropping seasons. As the focus was on genetic diversity for NUE, the experiments were conducted with the recommended doses of P and K in order to minimize risks of interaction with other nutritional stresses.

## 2. Materials and methods

The experiments were conducted in three consecutive rice growing seasons, 2012–2013, 2013–2014 and 2014–2015 (hereafter referred to as 2013, 2014 and 2015), each extending from November to April of the following year.

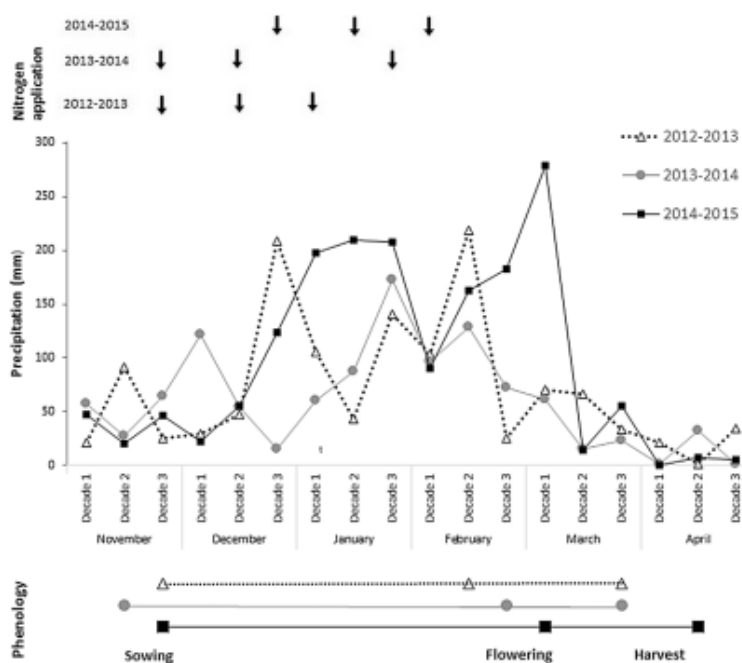


Fig. 1. Cumulated decadal rainfall distribution, sowing date, mean of flowering and harvesting date, nitrogen application date in the three cropping seasons (2013–2015) at the Ivory experimental station in Madagascar.

## 2.1. Site description, plant material

The experiments were conducted at Ivory, which is located in the mid-west of Madagascar (19°33'27 S, 46°24'43 E, 960 m asl.). The soil is ferrallitic, containing 0.82 g kg<sup>-1</sup> of total N, 16.6 g kg<sup>-1</sup> of organic matter, 0.17 cmolc kg<sup>-1</sup> of exchangeable K, 4.47 mg kg<sup>-1</sup> of Olsen-P and a pH of 4.98 in the top 20 cm of the soil profile. The slope of the experimental field was less than 1%. The monthly mean temperature at the site ranged from 23.6 °C to 25.7 °C during the three cropping seasons. Cumulative rainfall was 1 095 mm during the 2013 cropping season, 971 mm in 2014 and 1 600 mm in 2015. Cumulated decadal precipitation, the sowing dates, the average flowering and harvesting dates, and the dates of nitrogen applications in the three cropping seasons are presented in Fig. 1.

The plant material was composed of 13 tropical *japonica* rice varieties. The varieties are all suitable for cultivation in the upland conditions of mid-western Madagascar and are well distributed within the overall diversity of tropical *japonica* used in the breeding program conducted in Madagascar by FOFIFA and CIRAD (Supplementary Fig. 1). They originate from different breeding programs: CIAT in Colombia, IAC and EMBRAPA in Brazil, FOFIFA/CIRAD in Madagascar, CIRAD in Brazil and Africa Rice Center in Ivory Coast. A brief description of these varieties is provided in Table 1.

## 2.2. Crop management

The three experiments were conducted using different legume-upland rice rotations. In the first (2013) and the second (2014) experiments conducted in two adjacent fields, the preceding legume was *Mucuna* (*Mucuna pruriens*) established in 2012 and 2013 respectively. In the third experiment (conducted in 2015 in the same field as the first experiment), the preceding legume was Bambara groundnut (*Vigna subterranean*) established in 2014. *Mucuna* residues were incorporated into the soil, while the grains and straw of the other crops (Bambara groundnut and rice) were exported.

Field preparation for the rice crop started with ox plowing of the field followed by hand surfacing of the soil. Four to six rice seeds were sown per hill with 20 cm × 20 cm spacing. Right before sowing, the same base dressing of cattle manure (5 000 kg ha<sup>-1</sup>; 0.82% N), triple superphosphate (69 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), potassium sulfate (62.4 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O) and dolomite (500 kg ha<sup>-1</sup>) was applied to each hill in all the plots. The manure application method and dose corresponded to standard farmers' fertilization practices for upland rice in the region.

**Table 1**

Main characteristics of the 13 upland rice varieties used in this study. Plant height and days to flowering figures are means over the three seasons and two N levels of the experiment presented in the paper.

Variety name	Abbreviation in the text	Abbreviation in the figure	Breeding center	Country	Plant Height (cm)	Days to flowering (50% plants)
126-C409-8-1-2	126C409	126C	CIAT	Colombia	97	84
B22 (CNA 095-BM 30-BM 27-P 35-2)	B22	B22	EMBRAPA	Brazil	112	88
CNA 4136 (CNA 095-BM8-BM 35-P2)	CNA4136	CNA	EMBRAPA	Brazil	117	91
FOFIFA 159	F159	F159	CIRAD-FOFIFA	Madagascar	122	94
IAC 25	IAC25	IAC	IAC	Brazil	129	93
NERICA 10	N10	N10	AFRICA RICE	Ivory Coast	93	77
NERICA 4	N4	N4	AFRICA RICE	Ivory Coast	105	90
NERICA 9	N9	N9	AFRICA RICE	Ivory Coast	98	89
PCT11 MAD2007\0\0 3-3-1-3-2-2	PCT11	PCT	CIAT	Colombia	90	86
PRIMAVERA	PRIMAVERA	PRI	IAC	Brazil	109	94
SCRID195-1-5-3-1	SCRID195	SC	CIRAD-FOFIFA	Madagascar	113	97
SEBOTA 402	SEBOTA402	SB	CIRAD	Brazil	103	94
WAB 880-1-32-1-1-P2-HB-1	WAB880	WAB	AFRICA RICE	Ivory Coast	115	92

CIAT: International Center for Tropical Agriculture – Colombia.

CIRAD: French agricultural research and international cooperation organization for development– France.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Brazil.

FOFIFA: National Center for Applied Research in Rural Development – Madagascar.

IAC: Instituto Agronômico de Campinas – Brazil.

To protect the crop from white grubs (the larval stage of scarab beetles) and adult black beetles that feed on rice roots (Randriamanantsoa et al., 2010), the rice seeds were treated with an insecticide (35% imidacloprid + 10% thiram, at 2.5 g kg<sup>-1</sup> of seeds) before sowing. The rice crop was hand-weeded whenever needed.

## 2.3. Experimental design and nitrogen applications

The 13 varieties were evaluated under two contrasted levels of inorganic nitrogen application: a low nitrogen level (LN) with no inorganic nitrogen inputs and a high nitrogen level (HN) corresponding to 90 kg ha<sup>-1</sup> N in 2013 and 2014; and 120 kg ha<sup>-1</sup> N in 2015, using urea (46% N). Urea was split into three equal amounts and applied to all varieties at the same time around the emergence stage, tillering stage and booting stage (Fig. 1). Each year, the experiment was conducted in a randomized complete block design with six replications. Twenty-six combinations of treatments were compared (13 varieties × 2 levels of fertilization). The size of elementary plot was 2 m × 3.8 m with a total of 190 hills per plot. The blocks were positioned perpendicular to the field slope.

## 2.4. Sampling and measurements

### 2.4.1. Measurements of biomass, yield and yield components

At the flowering stage, the leaf area index (LAI) was measured non-destructively within individual plots using a SunScan (Delta-T Devices, Cambridge, UK) placed under the rice canopy. LAI is defined as the total leaf surface area over a specific area of land and is used as an indicator of aboveground biomass. The Sunscan estimates a "plant area index" that includes stems and panicles as well as leaves. The LAI was measured at the flowering stage with five readings per plot (Table 2). Then, in each plot, whole plants from four hills (0.16 m<sup>2</sup>) were cut at the soil level and pooled to form one sample. The plant samples were oven dried at 60 °C for 72 h and weighed to estimate biomass at flowering (BFL).

At maturity, whole plants from nine hills (0.36 m<sup>2</sup>) were harvested in the middle of each plot and separated into straw and panicles. The panicles were counted, hand threshed, and filled spikelets were separated from unfilled spikelets. The dry weights of filled spikelets and unfilled spikelets were determined after oven drying at 60 °C for 72 h. Filled spikelets were used to estimate grain yield (GY) and grain N concentration (GNC). Two sub-samples of 200 filled spikelets and 200 unfilled spikelets were weighed to calculate the total number of filled

**Table 2**  
Description of the 21 measured and calculated traits.

Code	Traits	Formulas	Units
AEN	Agronomic efficiency of N	$GY_{HN} - GY_{LN}/N$ applied	kg grain kg <sup>-1</sup> N
BFL	Biomass at flowering (aboveground)	$10 \times$ Biomass of 4 hills/0.16	kg ha <sup>-1</sup>
DTFL	Flowering time	Times from sowing to flowering	days
FG	Filled grain	$100 \times$ number of filled spikelets/total number of spikelets	%
FLNC	Whole plant N concentration at flowering	plant N concentration of 4 hills at flowering	%
FLNUP	Nitrogen uptake at flowering	$BFL \times FLNC/100$	kg ha <sup>-1</sup>
GNC	Grain N content	Grain N concentration of 9 hills at maturity	%
GY	Grain yield	$PANM2 \times SPIPAN \times FG \times TGW \times 10$	kg ha <sup>-1</sup>
HI	Harvest index	$GY/(GY + SY)$	-
LAI	Leaf index area	-	m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>
NHI	Nitrogen harvest index	$GNC \times GY/TNUP$	-
NUE	Nitrogen use efficiency	$GY/N$ supply	kg grain kg <sup>-1</sup> N
NUPE	Nitrogen uptake efficiency	$TNUP/N$ supply	kg N kg <sup>-1</sup> N
NUTE	Nitrogen utilization efficiency	$GY/TNUP$	kg grain kg <sup>-1</sup> N
PANM2	Number of panicles per m <sup>2</sup>	Number of panicle of 9 hills/0.36	-
POSTFLNUP	Nitrogen uptake after flowering	$TNUP - (BFL \times FLNC/100)$	kg ha <sup>-1</sup>
SNC	Straw N content	Straw N concentration of 9 hills at maturity	%
SPIPAN	Number of spikelets per panicle	Number of spikelets of 9 hills/number of panicle of 9 hills	-
SY	Straw yield	$10 \times$ Biomass of 9 hills/0.36	kg ha <sup>-1</sup>
TGW	1000-grain weight	Weight of 200 filled spikelets $\times$ 5	g
TNUP	Total plant N uptake	$GNC \times GY + SNC \times SY$	kg ha <sup>-1</sup>

and unfilled spikelets and 1 000-grain weight (TGW). The number of panicles per m<sup>2</sup> (PANM2), the number of spikelets per panicle (SPIPAN) and the percentage of filled grains (FG) were calculated. Straw samples were oven dried at 60 °C for 72 h and weighed to estimate straw yield (SY). The harvest index (HI) was then calculated from GY and SY (Table 2).

#### 2.4.2. Measurement of nitrogen concentration

The concentration of N in the whole above ground plant at flowering (FLNC) and of filled grain (GNC) and straw (SNC) at harvest was determined by near-infrared spectroscopy (NIRS). On the one hand, NIRS was measured on dried samples (oven-dried at 60 °C for 72 h), ground to 1 mm, using a model 1093 Cyclotech sample mill (FOSS, Höganäs, Sweden), using a monochromator (LabSpec 4 Standard-Res Lab Analyzer, ASD Inc., Boulder, USA; wavelengths 1 000–2 500 nm). All the samples were scanned four times and the spectra were averaged. On the other hand, a reference laboratory method (Dumas combustion method using a Leco N-analyser, FP528-LECO Corp.) was used to determine the N concentration of the samples. A first calibration equation was constructed to estimate FLNC and SNC using a pool of 188 samples collected at flowering time and 182 samples collected at harvest. This equation had a R<sup>2</sup> of 0.97 and a standard error of prediction (SEP) of 0.1 (Supplementary Fig. 2). A second equation was constructed to estimate GNC using 179 grain samples collected at harvest with a R<sup>2</sup> of 0.94 and a SEP of 0.06 (Supplementary Fig. 2).

#### 2.4.3. Other measured and calculated traits

The number of days to flowering (DTFL) was recorded at the 50% flowering stage i.e. when the anthers are extruded from the spikelets in 50% of the plants in each plot. Total nitrogen uptake (TNUP) was calculated as  $(GY \times GNC/100) + (SY \times SNC/100)$ ; nitrogen harvest index (NHI) as  $GY \times GNC/(100 \times TNUP)$ , and the nitrogen uptake after flowering (POSTFLNUP) as  $TNUP - (BFL \times FLNC/100)$ . The estimation of nitrogen use efficiency (NUE) and its components nitrogen uptake efficiency (NUPE), and nitrogen utilization efficiency (NUTE) were calculated according to the method suggested by Moll et al. (1982), and is presented in Table 2. In the LN treatment, soil N supply was estimated as the maximum amount of plant N uptake, among all individual plots of a given replication in the LN treatment. In the LN treatment, total N supply was equal to soil N supply and in the HN treatment, it was calculated as the sum of soil N supply of the corresponding replication plus the amount of inorganic N applied. The

agronomic efficiency of N fertilizer (AEN), which represents the amount of grain produced per unit of N applied in kg<sup>-1</sup> N, was calculated as  $(GY$  under the HN treatment  $- GY$  under the LN treatment)/quantity of N fertilizer.

#### 2.5. Statistical analysis

Analysis of variance was performed using the SAS/STAT statistical analysis package (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The statistical model used included sources of variation due to year, genotype, N level, replication and the interaction of year  $\times$  genotype, year  $\times$  N level, genotype  $\times$  N level and year  $\times$  N level  $\times$  genotype. They were all considered as fixed effects (model  $Y =$  year, genotype, N level, replication, year  $\times$  genotype, year  $\times$  N, genotype  $\times$  N, year  $\times$  genotype  $\times$  N). Pearson phenotypic correlation coefficients based on means of varieties over replicates were calculated for all traits, using PROC CORR (SAS). Broad-sense heritability (H<sup>2</sup>) for all traits at each level of N was calculated from variance components obtained using the REML option of SAS PROC VARCOMP. In the model, replication was considered as a fixed effect and genotype and genotype-year interaction were considered as random effects:

$$H^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P,$$

$$\text{where } \sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_{I/n} + \sigma^2_{E/nr}$$

$\sigma^2_G$  = genotypic variances,  $\sigma^2_{I/n}$  = interaction variances,  $\sigma^2_E$  = error variances, n = number of years and r = number of replications.

The contribution of the variation in the component traits, NUPE and NUTE, to the variation in NUE was analyzed out as described in Moll et al. (1982) at each level of N fertilizer and for each year. If  $Y_n$  is the log of a resultant trait and  $X1_n, X2_n$  the logs of two component traits at the n<sup>th</sup> N level, then:

$$Y_n = X1_n + X2_n,$$

$\sum (X1_n Y_n) / \sum Y_n^2$  and  $\sum (X2_n Y_n) / \sum Y_n^2$  represent the net contribution of each component to the dependent trait.

### 3. Results

#### 3.1. Interaction with growing season (year)

The results of the combined analysis of variance across three years for

Table 3

F-values and significance of the variance components of the factorial design combining year, genotype and nitrogen level of the 21 traits. Broad-sense heritability ( $H^2$ ) in low nitrogen (LN) and high nitrogen (HN) treatments.

Trait	Year	N level	Genotype	Y × N	Y × G	G × N	Y × N × G	Replication	$H^2_{LN}$	$H^2_{HN}$
BFL	97.06 **	168.66 **	19.76 **	17.29 **	4.22 **	0.95ns	0.82ns	4.24 **	0.76	0.76
DTFL	2253.1 **	19.59 **	255.37 **	10.09 **	9.77 **	1.37ns	1.16ns	4.19 **	0.95	0.97
FG	66.81 **	69.99 **	32.52 **	1.44ns	3.05 **	1.74ns	1.53ns	2.90 **	0.88	0.86
FLNC	123.68 **	230.65 **	39.27 **	36.79 **	3.89 **	2.75 **	1.21ns	3.50 **	0.83	0.90
FLNUP	9.42 **	327.95 **	5.09 **	31.85 **	2.91 **	1.05ns	1.12ns	4.49 **	0.52	0.25
GNC	103.93 **	335.16 **	11.04 **	42.09 **	2.45 **	1.95 *	1.25ns	4.38 **	0.65	0.76
GY	150.04 **	87.44 **	8.99 **	14.73 **	3.16 **	0.63ns	1.24ns	3.35 **	0.50	0.59
HI	158.21 **	53.70 **	100.25 **	3.31 *	6.04 **	2.73 **	1.60 *	3.08 **	0.93	0.93
LAI	91.90 **	372.76 **	21.36 **	25.37 **	3.54 **	1.17ns	1.06ns	8.08 **	0.84	0.76
NHI	74.73 **	8.54 **	34.49 **	5.36 **	2.35 **	1.13ns	2.09 **	2.49 **	0.84	0.92
NUE	15.97 **	520.29 **	8.56 **	5.26 **	3.32 **	1.81 *	1.84 **	4.47 **	0.48	0.58
NUPE	13.32 **	194.69 **	3.94 **	8.43 **	2.28 **	1.19ns	1.69 *	3.49 **	0.20	0.31
NUTE	18.91 **	312.83 **	11.91 **	24.16 **	2.28 **	2.16 *	1.71 *	2.35 **	0.67	0.80
PANM2	71.54 **	164.29 **	22.89 **	9.61 **	1.34ns	0.75ns	0.85ns	2.92 **	0.89	0.92
POSTFLNUP	44.29 **	12.03 **	5.30 **	1.67ns	2.58 **	1.23ns	1.29ns	1.52ns	0.37	0.44
SNC	41.26 **	85.47 **	3.51 **	4.79 **	1.27ns	1.39ns	1.77 *	2.35 **	0.58	0.00
SPIPAN	130.11 **	13.79 **	25.01 **	9.50 **	3.71 **	0.48ns	0.59ns	2.74 **	0.78	0.88
SY	159.31 **	237.10 **	17.21 **	13.87 **	3.05 **	0.68ns	1.04ns	4.00 **	0.74	0.79
TGW	215.14 **	10.90 **	141.59 **	1.12ns	5.29 **	0.62ns	0.85ns	1.21ns	0.96	0.95
TNUP	143.13 **	274.84 **	3.69 **	26.20 **	2.14 **	0.72ns	1.19ns	4.13 **	0.17	0.33
AEN	10.71 **		0.51ns		1.00ns			1.27ns		
Degree of freedom	2	1	12	2	24	12	24	15		

\*\*, \*: F values significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. ns = non-significant at P = 0.05.

the 21 agronomic traits measured in 13 upland rice varieties are shown in Table 3. The effects of year, genotype and nitrogen level were highly significant for all traits except AEN for which genotype effect was not significant across years but was significant in 2015 (data not shown). A significant interaction was observed for most measured traits between Year and N treatment (Y\*N) as well as between Year and genotype (Y\*G). Given these interactions, the results of each year are presented separately in the following paragraphs. On the other hand, interactions between N treatment and genotype (N\*G) were not significant except for FLNC, GNC, HI, NUE and NUTE. Considering the two N treatments, six traits presented heritability < 0.5 (Table 3). Except for SNC and NUE, these traits were directly related to N uptake (NUPE, TNUP, FLNUP, POSTFLNUP). Overall, heritability did not differ much between LN and HN.

Growing seasons were highly contrasted mainly because of the very different rainfall distribution (Fig. 1): cumulated rainfall between sowing and harvest was 1095 mm in 2013, 971 mm in 2014, and 1600 mm in 2015, when cumulated reference crop evapotranspiration was 672, 614 and 548 mm, the cumulated daily radiation was 3008, 3116 and 2927 MJ m<sup>-2</sup> and the cumulated degree days (above a base of 10 °C) were 1628, 1684 and 1667 in 2013, 2014 and 2015, respectively. These differences in rainfall distribution probably affected N availability differently, during each phenological phase of rice and rice development, as already reported by Mae (1997). For instance, the PANM2 trait, which is determined during the vegetative phase (from emergence to panicle initiation), was higher in 2013 than in 2014 and 2015 (Table 4). Conversely, SPIPAN, which is determined during the

Table 4

Mean value, correlation of adjusted means of the 13 varieties between nitrogen level, percentage of variation across genotypes for each year and N level for 21 agronomic traits.

Trait	2013				2014				2015				Units
	LN	HN	corr <sup>a</sup>	%var <sup>b</sup>	LN	HN	corr <sup>a</sup>	%var <sup>b</sup>	LN	HN	corr <sup>a</sup>	%var <sup>b</sup>	
FLNUP	87.98	144.03	0.66*	64%*	106.05	121.59	0.58*	15%	79.52	129.98	0.55*	63%*	Kg.ha <sup>-1</sup>
TNUP	96.32	137.83	0.68*	43%*	117.32	129.55	0.49ns	10%*	65.03	107.17	0.19ns	65%*	Kg.ha <sup>-1</sup>
BFL	7477.24	10291.7	0.87*	38%*	7313.33	8138.35	0.91*	11%*	5653.29	7398.85	0.73*	31%*	Kg.ha <sup>-1</sup>
LAI	3.57	4.88	0.86*	37%*	3.03	3.62	0.88*	19%*	2.58	4.19	0.70*	62%*	m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>
SY	5181.7	6770.92	0.93*	31%*	4721.2	5358.63	0.73*	14%*	3521.08	4962.93	0.46	41%*	Kg.ha <sup>-1</sup>
GY	5246.97	6282.29	0.85*	20%*	5810.3	5964.49	0.66*	3% ns	3629.15	4859.73	0.53ns	34%*	Kg.ha <sup>-1</sup>
FLNC	1.2	1.43	0.92*	19%*	1.47	1.53	0.95*	4%*	1.4	1.76	0.62*	26%*	%
GNC	1.26	1.48	0.56*	17%*	1.46	1.52	0.8*	4%*	1.18	1.45	0.38ns	23%*	%
SNC	0.57	0.66	0.27ns	16%*	0.69	0.73	0.11ns	6%*	0.63	0.73	-0.1ns	16%*	%
PANM2	273.61	312.5	0.91*	14%*	237.61	268.27	0.79*	13%*	210.79	277.81	0.78*	32%*	-
SPIPAN	69.67	78.73	0.99*	13%*	100.15	96.98	0.89*	-3% ns	75.12	83.71	0.80*	11%*	-
DTFL	80	82	0.97*	2%*	95	96	0.98*	1%*	93	93	0.97*	0% ns	days
NHI	0.69	0.68	0.78*	-1%*	0.72	0.7	0.72*	-3%*	0.65	0.66	0.81*	2% ns	-
TGW	31.84	30.94	0.97*	-3%*	28.42	28.1	0.98*	-1% ns	27.55	27.12	0.98*	-2%*	g
HI	0.5	0.48	0.94*	-4%*	0.55	0.53	0.9*	-4%*	0.5	0.49	0.87*	-2%*	-
FG	89.51	85.9	0.8*	-4%*	88.52	85.22	0.86*	-4%*	84.02	78.85	0.73*	-6%*	%
NUPE	0.71	0.61	0.66*	-14%*	0.73	0.52	0.51ns	-29%*	0.68	0.5	0.17	-26%*	kg N kg <sup>-1</sup> N
NUTE	55.07	46.01	0.54ns	-16%*	49.63	46.17	0.52ns	-7%*	56.03	45.68	0.56*	-18%*	kg grain kg <sup>-1</sup> N
NUE	38.75	27.93	0.85*	-28%*	36.06	23.73	0.67*	-34%*	37.67	22.46	0.51ns	-40%*	kg grain kg <sup>-1</sup> N
POSTFLNUP	8.35	-6.2	0.3ns		11.27	7.96	0.71*		-14.49	-22.8	0.44ns		kg ha <sup>-1</sup>
AEN		11.50				1.71				10.25			kg grain kg <sup>-1</sup> N

<sup>a</sup> Pearson correlation coefficient: significant (\*) or not significant (ns) at p < 0.05

<sup>b</sup> Variation between LN and HN as a percentage of LN: significant (\*) or not significant (ns) at p < 0.05

reproductive phase (from panicle initiation to flowering), was higher in 2014 than in 2013 and 2015. In 2013 and 2014, average yields were higher than in 2015, which was characterized by an unusually high cumulative rainfall. For instance, under LN, average GY was 5 247 kg ha<sup>-1</sup>, 5 810 kg ha<sup>-1</sup> and 3 629 kg ha<sup>-1</sup> in 2013, 2014 and 2015 respectively (Table 4). In 2014, a very limited effect of the application of mineral N on yield (+3% only; 5 964 kg ha<sup>-1</sup> under HN and 5 810 kg ha<sup>-1</sup> under LN) was observed.

These contrasted climatic conditions seem to have interacted with the development of each variety, mainly according to their duration. For instance, in 2013, the variety with longest sowing-maturity cycle, SCR195, had the highest yield under LN and the second highest yield under HN (Fig. 2; Supplementary Table 1), whereas it was one of the worst yielding varieties in both 2014 (11th under HN and 10th under LN) and 2015 (13th under HN and 12th under LN). An opposite trend was observed for the variety with the shortest sowing-maturity cycle, NERICA 10, which ranked 11th and 10th in 2013, 6th and 3rd in 2014 and 3rd and 6th in 2015 in HN and LN respectively (Supplementary Table 1). Two other varieties, IAC25 and CNA4136, contributed to G × Y interaction. Unexpectedly, they performed inconsistently in 2014 and 2015. In 2014-LN, they produced lower yields than expected from the overall relationship between GY under LN and under HN (Fig. 2). Conversely, in 2015-LN, they produced higher yields than expected. However, WAB880 and 126C409, the two best yielding varieties on average ranked among the best yielding varieties whatever the year and the N treatment. WAB880 ranked 5th in 2013-HN, 3rd in 2013-LN and 1st in all other year × N treatment combinations (Fig. 2). 126C409 ranked 1st in 2013-HN, 2nd in 2013-LN, 2014-HN and 2014-LN, 4th in 2015-HN and 7th in 2015-LN (Supplementary Table 1).

### 3.2. Effects of the application of N fertilizer

The agronomic efficiency of N fertilizer (AEN) applied in the form of urea (90 kg N in 2013 and 2014 and 120 kg N in 2015) was low. The average AEN was 11.5 kg grain kg<sup>-1</sup> N, 1.71 kg grain kg<sup>-1</sup> N and 10.25 kg grain kg<sup>-1</sup> N in 2013, 2014 and 2015, respectively. In 2014, the difference between HN and LN was particularly small (Table 4); the GY in HN increased by only 3%. Under HN, GY increased by 20% in 2013 and 34% in 2015.

The traits most positively affected by N application were related to N uptake and biomass production. At flowering, FLNUP increased by 64% in 2013 and by 63% in 2015, corresponding to respectively 56.05 kg ha<sup>-1</sup> (62% of applied N), and 50.46 kg ha<sup>-1</sup> (42% of applied N) and by 15% in 2014, corresponding to 15.54 kg ha<sup>-1</sup> or 17% of applied N. These increases resulted from the combined increase in BFL and FLNC. BFL increased by 38%, 11% and 31%, while at the same time FLNC increased by 19%, 4% and 26% in 2013, 2014 and 2015, respectively. At harvest, TNUP increased by 43%, 10% and 65% in 2013, 2014 and 2015, respectively. This resulted from the combined increase in GY, SY, GNC and SNC. SY increased by 31%, 14% and 41% in 2013, 2014 and 2015, respectively. We observed increases of the same magnitude under the HN treatment for GNC (17%, 4% and 23%) and SNC (16%, 6% and 16%) in 2013, 2014 and 2015, respectively. At harvest, total biomass (GY + SY) increased by 25%, 7% and 37% in 2013, 2014 and 2015, respectively (Table 4).

PANM2 was the most responsive yield component to nitrogen application with an increase of 14%, 13% and 32% in 2013, 2014 and 2015, respectively. SPIPAN increased moderately, i.e. by 13% in 2013 and by 11% in 2015 but decreased slightly (-3%) in 2014 (Table 4). Conversely, TGW decreased by 3%, 1% and 2% and FG decreased by 4%, 4% and 6% in 2013, 2014 and 2015, respectively. Likewise, HI decreased under the HN treatment (-4%, -4% and -2% in 2013, 2014 and 2015, respectively).

NUE and its components decreased considerably under HN compared to LN. NUE decreased by 28%, 34% and 40%, respectively, in 2013, 2014 and 2015. Similarly, NUPE decreased by 14%, 29% and

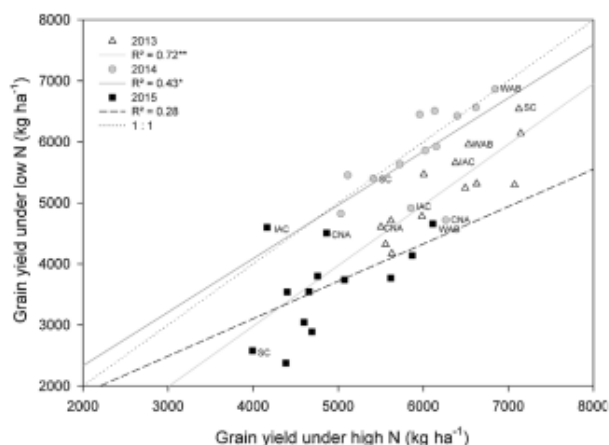


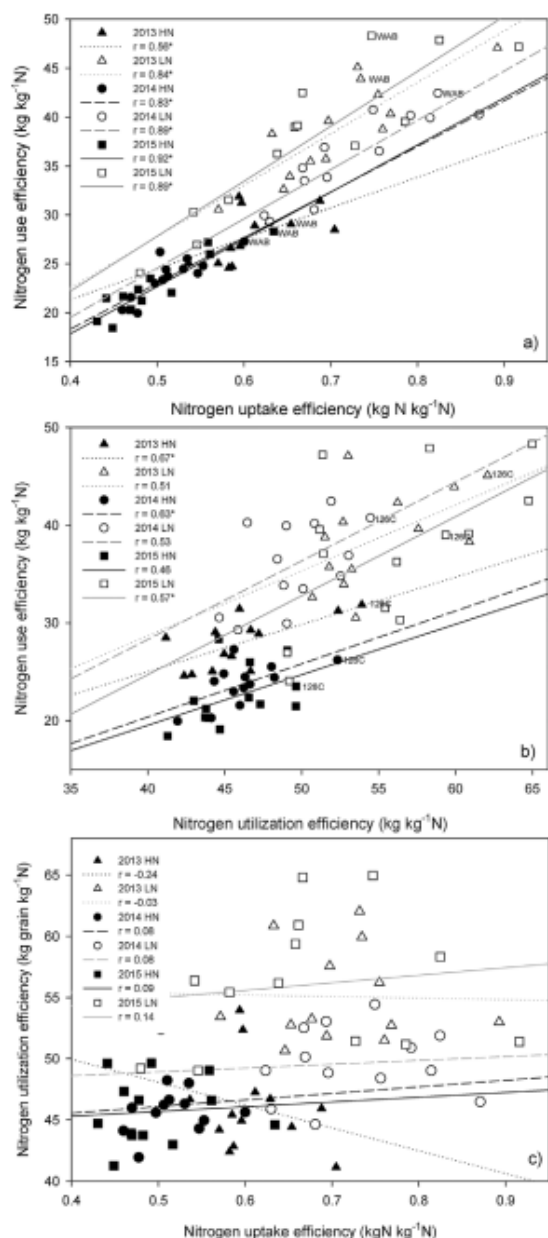
Fig. 2. Relationship between grain yield (t ha<sup>-1</sup>) under the low N treatment (LN) and the high N treatment (HN) for 13 upland rice varieties in the three cropping seasons. Linear regressions were calculated for the three years separately. Significant correlations are indicated by a solid line and \* at  $p < 0.05$  or \*\* at  $p < 0.01$ . Non-significant correlations are indicated by a dashed line. Abbreviations used for varieties: CNA: CNA 4136 - CNA 095-BM8-BM 35-P2; IAC: IAC25; WAB: WAB 880-1-32-1-1-P2-HB-1; SC: SCR195-1.5-3-1.

26%, and NUTE decreased by 16%, 7% and 18% in 2013, 2014 and 2015, respectively (Table 4). POSTFLNUP was negative in 2013 and 2015 under HN, and in 2015, under LN, suggesting that some N was lost between flowering and harvesting, although there was a clear increase in total biomass in the same period. However, it is interesting to note that POSTFLNUP (which is more a trade-off between N loss and N uptake after flowering in our experimental conditions) was higher under LN than under HN.

### 3.3. Genotype × N treatment interaction

The overall level of genotype × N treatment interaction was low. In agreement with the absence of genotype × N interaction for GY, combined analysis of variance showed no significant genotype × N interaction for any of the four GY component traits (PANM2, SPIPAN, FG, TGW; Table 3). The correlations between HN and LN for those components were always tight and highly significant:  $r = 0.91$ ,  $0.79$  and  $0.78$  for PANM2 in 2013, 2014 and 2015, respectively;  $r = 0.99$ ,  $0.89$  and  $0.80$  for SPIPAN,  $r = 0.80$ ,  $0.86$  and  $0.73$  for FG and  $r = 0.97$ ,  $0.98$  and  $0.98$  for TGW (Table 4). PCT11 and 126C409 varieties consistently presented the highest PANM2 across years and N levels (Supplementary Table 1). SEBOTA402 consistently had the highest SPIPAN across years and N levels; PRIMAVERA also had a high SPIPAN except in 2015, for unknown reasons (Supplementary Table 1). Four varieties, B22, CNA4136, F159 and IAC25, consistently presented the highest TGW across years and N levels (Supplementary Table 1). B22 and CNA4136 also almost consistently presented the highest FG across years and N treatments (Supplementary Table 1). WAB880, the best yielding variety, did not appear in this “per yield component” track record, indicating that the best yield was rather a trade-off between all yield components. Nevertheless, a significant interaction was found for NUTE, mainly due to WAB880. This best yielding variety in both LN and HN, presented consistently high NUTE under the LN treatment, beyond what would be expected from the overall relationship between LN and HN (data not shown). It is noteworthy that WAB880 also presented the lowest SNC under LN (the lowest in 2013 and 2014 and the second lowest in 2015 with 0.42%, 0.46% and 0.46%, respectively) (Supplementary Table 1).





**Fig. 3.** Relationship between nitrogen use efficiency (NUE) and nitrogen uptake efficiency (NUPE) (a); between nitrogen use efficiency (NUE) and nitrogen utilization efficiency (NUTE) (b) and between NUPE and NUTE (c) for 13 upland rice varieties grown in three Year  $\times$  two N treatment combinations. \* indicates significant correlation at  $p < 0.05$ . Abbreviations used for varieties: 126C: 126-C409-8-1-2; WAB: WAB 880-1-32-1-1-P2-HB-1.

**Table 5**

Contribution of nitrogen uptake efficiency (NUPE) and nitrogen utilization efficiency (NUTE) to the sum of squares of nitrogen use efficiency (NUE) in 13 upland rice varieties for each year and at each N level (high or low).

Resultant trait	Component trait	2013		2014		2015	
		high N	low N	high N	low N	high N	low N
Log (NUE)	Log (NUPE)	0.34	0.71	0.69	0.79	0.83	0.83
	Log (NUTE)	0.65	0.28	0.30	0.20	0.16	0.17

### 3.4. Contribution of NUPE and NUTE to NUE

The NUE of the 13 varieties ranged from 24.60 to 31.86 kg grain  $\text{kg}^{-1}$  under HN and from 30.55 to 47.08 under LN in 2013, from 19.94 to 27.26 under HN and from 29.29 to 42.44 under LN in 2014, from 18.43 to 28.32 under HN and from 24.06 to 48.30 under LN in 2015. The variability observed was higher under LN than under HN.

There was a significant positive correlation (minimum of  $r = 0.56$  to a maximum of  $r = 0.92$ ) between NUE and NUPE of the varieties in all years and under both LN and HN conditions (Fig. 3a). Significant positive correlations were also observed between NUE and NUTE under 2013-HN ( $r = 0.67$ ), 2014-HN ( $r = 0.63$ ) and 2015-LN ( $r = 0.57$ ) treatments (Fig. 3b). The variation in NUPE explained the variation in NUE better than NUTE except in 2013 under HN (Table 5). Correlations between NUPE and NUTE ranged between 0.03 and 0.24 and were not significant (Fig. 3c).

The variety WAB880 presented the highest overall average NUE. It ranked 5th in 2013-HN (NUE = 29.04), 3rd in 2013-LN (NUE = 43.92) and 1st in all the other year  $\times$  N treatment combinations. It also had the highest average NUPE under HN and the 2nd highest under LN (Supplementary Table 1). However, the two N treatment affected WAB880' NUTE differently: WAB880 ranked 3rd, 4th and 1st under the LN treatment and only 9th, 8th and 8th under the HN treatment, in 2013, 2014 and 2015, respectively.

The balance between NUPE and NUTE differed in the second best variety for NUE, 126C409 which had the best NUTE on average and ranked 1st for NUTE in all year  $\times$  N treatment combinations except in 2015-LN when it ranked 4th (Fig. 3b; Supplementary Table 1). However, 126C409 was less efficient for NUPE and ranked 8th, 6th, 9th, 6th, 5th and 8th in 2013-HN, 2013-LN, 2014-HN, 2014-LN, 2015-HN and 2015-LN respectively (Supplementary Table 1).

### 3.5. Relationship between NUE and agronomic and N-related traits

There was no significant correlation between NUE and DFL in any of the year  $\times$  N treatment combinations (Fig. 4; Supplementary Table 2). Nevertheless, the relationship changed from slightly positive in 2013 ( $r = 0.18$  in HN and  $r = 0.06$  in LN) to negative in 2014 ( $r = -0.36$  in HN and  $r = -0.48$  in LN) and 2015 ( $r = -0.51$  in HN and  $r = -0.46$  in LN). At flowering, there was no significant correlation between NUE and BFL ( $r$  ranged from  $-0.32$  to  $0.24$ ) nor NUE and LAI ( $r$  ranged from  $-0.43$  to  $0.22$ ) in any year  $\times$  N treatment combinations (Fig. 4). NUE was not significantly correlated with FLNC except in 2015-HN ( $r = 0.63$ ; Fig. 5; Supplementary Table 2). The correlation between NUE and FLNUP was significant only in 2013-LN ( $r = 0.66$ ) (Fig. 5).

At maturity, there was no significant correlation between NUE and SY except in 2015-LN ( $r = 0.56$ ). NUE was consistently positively correlated with HI ( $r$  ranged from  $0.39$  to  $0.88$ ) and these relationships were significant in 2014 and 2015 under both HN and LN treatments (Fig. 4; Supplementary Table 2). Concerning yield components, no significant correlation was found between NUE and SPIPAN ( $r$  ranged from  $-0.05$  to  $0.48$ ) nor between NUE and TGW ( $r$  ranged from  $-0.30$  to  $0.37$ ) in any year  $\times$  N treatment combination. There was no significant correlation between NUE and PG in any year  $\times$  N treatment combination except in 2015-LN ( $r = 0.57$ ). Conversely, NUE was consistently positively correlated with PANM2 ( $r$  ranged from  $0.50$  to  $0.73$ )

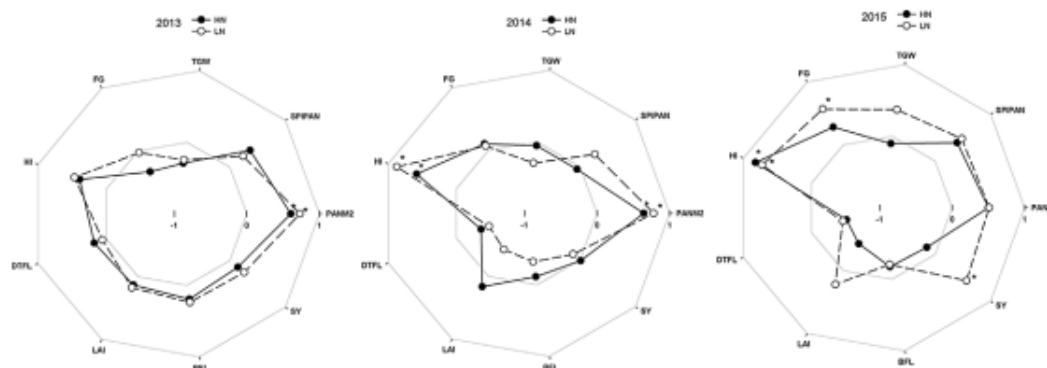


Fig. 4. Phenotypic correlation between nitrogen use efficiency (NUE) with 1000-grain weight (TGW), number of spikelets per panicle (SPIPAN), number of panicles per  $m^2$  (PANM2), straw yield (SY), biomass at flowering (BFL), leaf area index (LAI), days to flowering (DTFL), Harvest index (HI), filled grain (FG) for each year and level of N. \* indicates significant correlation at  $p < 0.05$ .

and these correlations were statistically significant in 2013 and 2014 under both HN and LN treatments (Fig. 4; Supplementary Table 2). The patterns of the radar plot of correlations between NUE and agronomic and N-related traits (Figs. 4 and 5) differed from one year to the next, reflecting the plasticity of the contribution of the different agronomic traits to NUE. The two curves corresponding to correlations in LN and in HN appeared more disjointed in 2015 than in 2013 or 2014. Moreover, positive and significant correlations were observed between NUE under LN and HN in 2013 and 2014 but not in 2015 (Table 4). More drastic adjustments may have occurred in the LN treatment in 2015, which corresponded to the most limiting conditions.

NUE was significantly positively correlated with TNUP in all year  $\times$  N treatment combinations ( $r$  ranging from 0.57 to 0.92; Fig. 5; Supplementary Table 2). NUE was significantly correlated with total grain N but not significantly correlated with total straw N in any year  $\times$  N treatment combinations (data not shown). NUE was significantly and positively correlated with NHI in 2014 and 2015 under both HN and LN treatments, and with POSTFLNUP under LN, in 2014 and 2015 ( $r = 0.67$  and  $r = 0.74$ ; Fig. 5; Supplementary Table 2). A significant negative relationship between NUE and GNC was observed only under the HN treatment in 2013, corresponding to the highest values of GNC (Fig. 5; Supplementary Table 2). In all other year  $\times$  N treatment combinations, NUE and GNC were not significantly correlated with  $r$  ranging from  $-0.14$  to  $0.35$  (the relationship was exactly the same between GY and GNC; Supplementary Table 2). Although NUTE was consistently negatively correlated with GNC in all year  $\times$  N treatment combinations, the correlations were only significant in 2013-HN and 2014-LN ( $r = -0.6$  and  $r = -0.56$  respectively; Supplementary Table 2). NUE was significantly correlated with SNC only in 2015-HN ( $r = 0.57$ ; Fig. 5).

#### 4. Discussion

A highly significant effect of year, year-by-genotype and year-by-N interactions was observed for almost all measured and computed variables over the three years of evaluation of 13 upland rice varieties under two levels of N inputs. We attribute the year effect mainly to significant differences in rainfall distribution (and the resulting leaching or runoff of N), which very probably resulted in differences in the dynamics of N availability for the rice crop. For cereal crops, the agronomic efficiency of N (AEN), which is the increase in grain yield due to N application, ranges from 10 to 30  $\text{kg grain kg}^{-1}$  N applied (Dobermann, 2005). Ladha et al. (2005) reported AEN values of 24.2, 22.0 and 18.1  $\text{kg grain kg}^{-1}$  N for maize, rice and wheat, respectively, after a meta-analysis of 93 published studies. In our experiment, we measured much lower AEN (11.5, 1.71 and 10.25  $\text{kg grain kg}^{-1}$  N in 2013, 2014 and 2015, respectively). This was barely cost effective because the increase in grain yield for farmers was worth between 0.2 and 1.6 fold the cost of the urea applied, based on the price of paddy in the villages in 2016. Saito et al. (2006) also found low AEN, 2.8 and 11.6  $\text{kg grain kg}^{-1}$ , for three traditional and three improved upland rice varieties in northern Laos, respectively. These authors reported that the application of N was only profitable when improved varieties were used. We used urea as a source of N in our experiment. Urea is susceptible to volatilization. Although lower losses are expected through volatilization in acidic soils like in our experiment, they may not be negligible (Whitehead and Raistrick, 1990). Urea is also susceptible to leaching but to a lesser extent than fertilizers containing  $\text{NO}_3^-$  (Ladha et al., 2005). The low agronomic efficiency of N observed in all the experiments may result from the combination of N leaching, and N



Fig. 5. Phenotypic correlation between nitrogen use efficiency (NUE) with grain N concentration (GNC), nitrogen uptake at flowering (FLNUP), whole plant N concentration at flowering (FLNC), nitrogen utilization efficiency (NUTE), nitrogen uptake efficiency (NUPE), nitrogen uptake after flowering (POSTFLNUP), nitrogen harvest index (NHI), total nitrogen uptake (TNUP), straw N concentration (SNC) at HN and LN levels in 2013, 2014 and 2015. \* indicates significant correlation at  $p < 0.05$ .

runoff or even some N volatilization. The relative importance of the three processes involving N losses thus require further investigation. In particular, in 2015, a lot of N could have been lost through leaching or runoff due to heavy rainfall, leading to lower N uptake compared to the other years. Given these climatic constraints, the agronomic and economic efficiency of other forms of N fertilizer, with slower or controlled N release characteristics (Zheng et al., 2017) should be investigated.

The present experiment revealed the existence of significant genetic variability for NUE, NUPE and NUTE under both HN and LN treatments among a set of 13 varieties representative of the genetic diversity of the tropical japonica group adapted for upland cultivation at mid-altitude in Madagascar. It also revealed an overall low level of AEN and its genetic variability as well as an overall low level of G × N interaction. These findings should now be investigated using more contrasted N levels and especially a more stressful low N condition than the one we tested here (using less manure and non-leguminous rotations). The variation in NUPE accounted for more of the variation in NUE than the variation in NUTE (Fig. 3). There was no correlation between NUPE and NUTE, either under HN or under LN, whatever the year. A similar observation was made by Barraclough et al. (2010) in wheat, suggesting it might be possible to improve the two NUE components independently. Interestingly, the two best varieties for NUE and GY, WAB880 and 126C409, presented complementary characteristics for NUE components: WAB880 had the best NUPE and 126C409 had the best NUTE among the 13 varieties studied. Crossing these two varieties may thus make it possible to obtain recombinant lines with improved NUE. WAB880 is particularly attractive as it appeared to be well adapted to LN conditions, when it presented higher NUTE than expected from the overall relationship between NUTE under LN and under HN and the lowest SNC among the 13 varieties.

We did not observe the frequently reported negative relationship between NUE and GNC (Bogard et al., 2010), except in the 2013-HN treatment ( $r = -0.62$ ; Fig. 5), which corresponded to the best N nutrition conditions in all the year × N treatment combinations studied (characterized by the highest average TNUP and FLNUP). However, NUTE was consistently negatively correlated with both GNC and SNC, like in other studies on rice (Tirol-padre et al., 1996; Inthapanya et al., 2000; Koutroubas and Ntanos, 2003; Wu et al., 2016; Supplementary Table 2). In our experiments, GNC ranged from 1.14% to 1.70% across varieties, N levels and years (Supplementary Table 1). It was higher than the GNC observed in 180 accessions of irrigated rice studied at suboptimal levels of soil N by Tirol-padre et al. (1996), which ranged from 0.91% to 1.46%. It was also slightly higher than the reference range of 1.0–1.5% N in the dry matter of filled grains reported by Mae (1997) for irrigated rice. Similarly, it was higher than the GNC found by Inthapanya et al. (2000), which ranged from 0.75% to 1.05% across 16 rice accessions, three sites and two N levels in rainfed lowland conditions. In wheat, Barraclough et al. (2010) found a negative relationship between GY and GNC that was tighter under high levels of applied N (between 200 and 350 kg N ha<sup>-1</sup>) than at low levels (0 and 50 kg N ha<sup>-1</sup>). This negative correlation was consistent over 27 environments in Bogard et al. (2010), but their lowest N treatment was 60–80 kg of applied N, not counting the supply of soil N. The absence of a negative relationship between GY and GNC observed in this study under LN should thus enable the improvement of GY in upland rice without any detrimental effect on grain quality.

After flowering, grain filling depends on two sources of nitrogen: N remobilized from vegetative organs and newly absorbed N. In our experiment, we intended to measure POSTFLNUP as the difference in N uptake between flowering and maturity but we found negative values (in 2013 under HN and 2015 under both HN and LN) suggesting that some N was lost despite a clear increase in total aboveground biomass between flowering and harvest (from + 27% up to + 44%, Table 4). Although our measurements of N uptake at flowering and at maturity may lack precision given the low heritabilities observed, gaseous N losses from plants > 70 kg N ha<sup>-1</sup> have been documented depending

on the plant species, fertilization, soil and climatic conditions (Francis et al., 1993; Raun and Johnson, 1999). Gaseous N losses may occur at the crop level because of an imbalance between N accumulation and N assimilation (Xu et al., 2012). Rice can lose significant amounts of ammonia from its leaves in relation to photorespiration and glutamine synthase activity (Kumagai et al., 2011). We measured up to 22 kg N loss per hectare between flowering and harvest (in 2015 under HN) and this may be an underestimation because N is also simultaneously taken up. In rice, 60–90% of the total carbon accumulated in panicles at harvest is derived from photosynthates produced after heading (Mae, 1997). In contrast, the proportion of panicle N that originates from post flowering uptake is only between 10% and 30% (Mae, 1997). However, it is noteworthy that in our experiment, POSTFLNUP was always higher under LN than under HN. Moreover, a positive and significant correlation between NUE and POSTFLNUP was found in 2014 and 2015 under the LN treatment (Fig. 5), suggesting that POSTFLNUP may be of particular importance under LN. There is a need for further investigation of the relative contribution of improved remobilization efficiency (through a reduction in N losses) and/or improved post flowering N uptake in this adaptation to LN. The stay-green trait (the capacity for a variety to delay leaf senescence and thus maintain photosynthesis during grain filling) has been linked with improved performance in sorghum (Borrell and Hammer, 2000) and maize (Mi et al., 2003) under LN. In wheat, nitrogen uptake and remobilization after flowering has been reported to contribute largely to GY and grain protein concentration (Kichey et al., 2007), and the onset of post-anthesis senescence was positively correlated with NUTE under the LN treatment but not under HN (Gaju et al., 2011). The relationship between stay-green and NUE thus needs to be investigated in upland rice particularly under LN supply. As maintaining the rice plant photosynthetically active during grain filling is antagonistic to the remobilization of N associated with leaf senescence, further study is needed of the genetic variation in post-flowering N uptake under limiting N conditions and its contribution to yield. The genetic variability of the root system (architecture and biomass) and its relationship with NUPE have been the subject of few studies in rice (Ju et al., 2015; Pan et al., 2016) and require further investigation, particularly in upland rice under LN conditions. When mineral elements are limiting, plants often adapt by allocating a higher proportion of their biomass to the root system (Hermans et al., 2006).

## 5. Conclusion

The purpose of this study was to estimate the importance of the rice genotypic variability for NUE in a rainfed upland ecosystem, and to identify proxy target traits for NUE improvement, especially under low N availability. The study revealed significant varietal differences for NUE that were achieved through complex trade-offs between component traits and complex interactions with environmental conditions. However, the number of panicles per m<sup>2</sup> and the harvest index were consistently positively correlated with NUE. Nitrogen uptake after flowering was also positively correlated with NUE particularly under the low N treatment. Direct selection on this trait may not be easy in a classic breeding program because it is difficult and costly to implement on a large number of individuals. However, the identification of new traits related to NUE should be useful for its genetic dissection (QTLs, GWAS, etc.) or for the development of genomic selection for NUE. Further research is needed to better understand N dynamics (N uptake, N remobilization, gaseous N loss from the leaves) between flowering and harvesting to improve NUE under low N availability. The genetic variability of root traits in relation to NUE also remains to be explored.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the excellent FOFIFA field staff in Madagascar. This work was supported jointly by Cariplo and Agropolis Foundations.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2017.07.023>.

## References

- Alvarez, S., Rufino, M.C., Vayssières, J., Salgado, P., Tittonell, P., Tillard, E., Bocquier, F., 2014. Whole-farm nitrogen cycling and intensification of crop-livestock systems in the highlands of Madagascar: an application of network analysis. *Agric. Syst.* 126, 25–37.
- Atlin, G.N., Frey, K.J., 1989. Breeding crop varieties for low-input agriculture. *Am. J. Altern. Agric.* 4, 53–58.
- Balasubramanian, V., Sie, M., Hijmans, R.J., Otsuka, K., 2007. Increasing rice production in sub-Saharan Africa: challenges and opportunities. *Adv. Agron.* 94, 55–133.
- Barraclough, P.B., Howarth, J.R., Jones, J., Lopez-Bellido, R., Parmar, S., Shepherd, C.E., Hawkesford, M.J., 2010. Nitrogen efficiency of wheat: genotypic and environmental variation and prospects for improvement. *Eur. J. Agron.* 33, 1–11.
- Bogard, M., Allard, V., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Machet, J.-M., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Martre, P., Le Gouis, J., 2010. Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *J. Exp. Bot.* 61, 4303–4312.
- Borrell, A.K., Hammer, G.L., 2000. Nitrogen dynamics and the physiological basis of stay-green in sorghum. *Crop Sci.* 40, 1295–1307.
- Ceccarelli, S., 1996. Adaptation to low/high input cultivation. *Euphytica* 92, 203–214.
- Dawson, J.C., Huggins, D.R., Jones, S.S., 2008. Characterizing nitrogen use efficiency in natural and agricultural ecosystems to improve the performance of cereal crops in low-input and organic agricultural systems. *Field Crops Res.* 107, 89–101.
- De Datta, S.K., Broadbent, F.E., 1988. Methodology for evaluating nitrogen utilization efficiency by rice genotypes. *Agron. J.* 80, 793–798.
- De Datta, S.K., Broadbent, F.E., 1990. Nitrogen-use efficiency of 24 rice genotypes on an N-deficient soil. *Field Crops Res.* 23, 81–92.
- De Datta, S.K., Broadbent, F.E., 1993. Development changes related to nitrogen-use efficiency in rice. *Field Crops Res.* 34, 47–56.
- Dobermann, A.R., 2005. Nitrogen Use Efficiency – State of the Art. *Agronomy – Faculty Publications* (Paper 316).
- Fageria, N.K., Morais, O.P.d., Santos, A.B.d., 2010. Nitrogen use efficiency in upland rice genotypes. *J. Plant Nutr.* 33, 1696–1711.
- Francis, D.D., Schepers, J.S., Vigil, M.F., 1993. Post-anthesis nitrogen loss from corn. *Agron. J.* 85, 659–663.
- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Snape, J.W., Heumez, E., LeGouis, J., Moreau, D., Bogard, M., Griffiths, S., Orford, S., Hubbert, S., Foulkes, M.J., 2011. Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Res.* 123, 139–152.
- Gallais, A., Coque, M., 2005. Genetic variation and selection for nitrogen use efficiency in maize: a synthesis. *Maydica* 50, 531.
- Garnett, T., Plett, D., Heuer, S., Okamoto, M., 2015. Genetic approaches to enhancing nitrogen-use efficiency (NUE) in cereals: challenges and future directions. *Funct. Plant Biol.* 42, 921–941.
- Haefele, S.M., Jabbar, S.M.A., Siopongco, J.D.L.C., Tirol-Padre, A., Amarante, S.T., Sta Cruz, P.C., Cosico, W.C., 2008. Nitrogen use efficiency in selected rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under different water regimes and nitrogen levels. *Field Crops Res.* 107, 137–146.
- Hermans, C., Hammond, J.P., White, P.J., Verbruggen, N., 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* 11, 610–617.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., Gallais, A., 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J. Exp. Bot.* 58, 2369–2387.
- Inthapanya, P., Sihavong, P., Sihathep, V., Champhengsay, M., Fukai, S., Basnayake, J., et al., 2000. Genotype differences in nutrient uptake and utilisation for grain yield production of rainfed lowland rice under fertilised and non-fertilised conditions. *Field Crops Res.* 65, 57–68.
- Ju, C., Buresh, R.J., Wang, Z., Zhang, H., Liu, L., Yang, J., Zhang, J., 2015. Root and shoot traits for rice varieties with higher grain yield and higher nitrogen use efficiency at lower nitrogen rates application. *Field Crops Res.* 175, 47–55.
- Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F., Le Gouis, J., 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.): post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Res.* 102, 22–32.
- Koutroubas, S., Ntanos, D., 2003. Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in Indica and Japonica rice under Mediterranean conditions. *Field Crops Res.* 83, 251–260.
- Kumagai, E., Araki, T., Hamaoka, N., Ueno, O., 2011. Ammonia emission from rice leaves in relation to photorespiration and genotypic differences in glutamine synthetase activity. *Ann. Bot.* 108, 1381–1386.
- Ladha, J.K., Pathak, H.J., Krupnik, T., Six, J., van Kessel, C., 2005. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. *Adv. Agron.* 87, 85–156.
- Le Gouis, J., Béghin, D., Heumez, E., Pluchard, P., 2000. Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *Eur. J. Agron.* 12, 163–173.
- Mae, T., 1997. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant Soil* 196, 201–210.
- Mi, G., Liu, J., Chen, F., Zhang, F., Cui, Z., Liu, X., 2003. Nitrogen uptake and remobilization in maize hybrids differing in leaf senescence. *J. Plant Nutr.* 26, 447–459.
- Minten, B., Randrianarisoa, J.-C., Barrett, C.B., 2007. Productivity in Malagasy rice systems: wealth-differentiated constraints and priorities. *Agric. Econ.* 37, 225–237.
- Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., 1982. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agron. J.* 74, 562–564.
- Pan, S., Liu, H., Mo, Z., Patterson, B., Duan, M., Tian, H., Hu, S., Tang, X., 2016. Effects of nitrogen and shading on root morphologies, nutrient accumulation, and photosynthetic parameters in different rice genotypes. *Sci. Rep.* 6, 32148.
- Raboin, L.M., Randriambololona, T., Radanielina, T., Ramanantsoanirina, A., Ahmadi, N., Dusserre, J., 2014. Upland rice varieties for smallholder farming in the cold conditions in Madagascar's tropical highlands. *Field Crops Res.* 169, 11–20.
- Randriamanantsoa, R., Aberlenc, H.P., Ralisoa, O.B., Ratnadass, A., Vercambre, B., 2010. Les larves des Scarabaeoidea (Insecta, Coleoptera) en riziculture pluviale des régions de haute et moyenne altitudes du Centre de Madagascar. *Zoosystema* 32, 19–72.
- Raun, W.R., Johnson, G.V., 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron. J.* 91, 357–363.
- Saito, K., Futakuchi, K., 2009. Performance of diverse upland rice cultivars in low and high soil fertility conditions in West Africa. *Field Crops Res.* 111, 243–250.
- Saito, K., Linquist, B., Atlin, G.N., Phanthaboon, K., Shiraiwa, T., Horie, T., 2006. Response of traditional and improved upland rice cultivars to N and P fertilizer in northern Laos. *Field Crops Res.* 96, 216–223.
- Singh, U., Ladha, J.K., Castillo, E.G., Punzalan, G., Tirol-Padre, A., Duqueza, M., 1998. Genotypic variation in nitrogen use efficiency: I. medium- and long-duration rice. *Field Crops Res.* 58, 35–53.
- Tabuchi, M., Abiko, T., Yamaya, T., 2007. Assimilation of ammonium ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 58, 2319–2327.
- Tirol-Padre, A., Ladha, J.K., Singh, U., Laureles, E., Punzalan, G., Akita, S., 1996. Grain yield performance of rice genotypes at suboptimal levels of soil N as affected by N uptake and utilization efficiency. *Field Crops Res.* 46, 127–143.
- Whitehead, D.C., Raistrick, N., 1990. Ammonia volatilization from five nitrogen compounds used as fertilizers following surface application to soils. *J. Soil Sci.* 41, 387–394.
- Wu, L., Yuan, S., Huang, L., Sun, F., Zhu, G., Li, G., Fahad, S., Peng, S., Wang, F., 2016. Physiological mechanisms underlying the high-grain yield and high-nitrogen use efficiency of elite rice varieties under a low rate of nitrogen application in China. *Front. Plant Sci.* 7, 1024.
- Xu, G., Fan, X., Miller, A.J., 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 153–182.
- Zaharah, A.R., Hanafi, M.M., 2009. Upland rice root characteristics and their relationship to nitrogen uptake. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 32, 261–266.
- Zaharah, A.R., Hanafi, M.M., 2014. Evaluation of upland rice genotypes for efficient uptake of nitrogen and phosphorus. In: International Atomic Energy Agency, Optimizing Productivity of Food Crop Genotypes in Low Nutrient Soils. IAEA-TECDOC-1721, IAEA, Vienna, pp. 287–299.
- Zheng, W., Liu, Z., Zhang, M., Shi, Y., Zhu, Q., Sun, Y., Zhou, H., Li, C., Yang, Y., Geng, J., 2017. Improving crop yields nitrogen use efficiencies, and profits by using mixtures of coated controlled-released and uncoated urea in a wheat-maize system. *Field Crops Res.* 205, 106–115.

## 1 **Annexe 7 : Article à soumettre et traduit en français dans la partie III du chapitre III**

### 2 **Genome Wide Association Study Of Nitrogen Use Efficiency And Related Agronomic** 3 **Traits In Upland Rice**

4 Tatiana RAKOTOSON<sup>1,3</sup>, Julie DUSSE<sup>4</sup>, Philippe LETOURMY<sup>4</sup>, Julien FROUIN<sup>5</sup>, Isabelle RAMONTA  
5 RATSIMALA<sup>2</sup>, Noronirina Victorine RAKOTOARISOA<sup>2</sup>, Tuong-Vi CAO<sup>5</sup>, Kirsten VOM BROCKE<sup>1,6</sup>, Alain  
6 RAMANANTSOANIRINA<sup>1</sup>, Nourollah AHMADI<sup>5</sup>, Louis-Marie RABOIN<sup>4</sup>

7 <sup>1</sup> FOFIFA - SRR Antsirabe, BP 230, Antsirabe 110, Madagascar.

8 <sup>2</sup> Université d'Antananarivo - Faculté des Sciences, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar.

9 <sup>3</sup> Université d'Antananarivo – IESAV, BP 108, Antsirabe 110, Madagascar.

10 <sup>4</sup> CIRAD Montpellier – UPR AIDA, TA B-115, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France.

11 <sup>5</sup> CIRAD Montpellier – UMR AGAP, TA A-108, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France.

12 <sup>6</sup> CIRAD Antsirabe – DP SPAD, Antsirabe 110, Madagascar.

13

## 14 **Introduction**

15 Increasing crop production is a world challenge to contribute to food security for a global  
16 population that will continue to grow in the next four decades (Godfray et al., 2010). Given the  
17 competition for land from other human activities and the alarming reduction of natural ecosystems and  
18 biodiversity (Cardinale et al., 2012), there is a need to produce more from the same amount of (or even  
19 less) land. Genetic improvement of crop productivity remains a major goal, and the importance of greater  
20 water and nutrient-use efficiency, as well as tolerance of abiotic stress will increase in this context of  
21 global environmental change. The development of new high-throughput genotyping, phenotyping and  
22 breeding methods should help explore the available genetic diversity in breeding germplasm and  
23 accelerate crop improvement (Tester and Langridge, 2010). These objectives are particularly relevant for  
24 upland rice (*Oryza sativa*) which is a subsistence crop in Sub-saharan Africa mostly cultivated in low-  
25 input cropping systems under high biotic and abiotic constraints.

26 Genome wide association studies (GWAS) have recently emerged as a powerful tool to mine  
27 interesting alleles in natural populations of crop plants. Genotyping with high-throughput low-coverage  
28 genome resequencing approach now allows for a genome wide coverage with SNP markers at reasonable  
29 costs (Huang and Han, 2014). GWAS rely on linkage disequilibrium (LD) to detect associations between  
30 phenotypic variations and DNA sequence variations (SNP markers). The power and resolution of  
31 association mapping depends on the extent of LD. A self-pollinating crop like rice, in which LD extends  
32 over more than 100 kb is thus ideally suited for GWAS. The drawback is that the identification of causal  
33 polymorphisms for phenotypic variations is not straightforward and requires follow-up analyses to sort  
34 among candidate genes (Han and Huang, 2013). Population structure and cryptic relatedness can result  
35 in false-positive associations between markers and phenotypes because population admixture creates LD  
36 between unlinked loci. Mixed models have been developed that take into account these different levels  
37 of relatedness (Yu et al. 2006) and implemented in the software TASSEL (Trait Analysis by Association,  
38 Evolution and Linkage; Bradbury et al., 2007) and further refined to reduce computing time (Zhang et  
39 al., 2010). GWAS have been successfully used to dissect a very large diversity of complex qualitative  
40 and quantitative traits in rice as thoroughly reviewed by Zhang et al. (2016) encompassing yield  
41 components, flowering time, plant growth and architecture, root growth and architecture, seed vigor at  
42 germination, grain morphology, grain quality, heavy metal content of grains, disease resistance, cold  
43 tolerance, salt tolerance, drought tolerance, spikelet heat tolerance, levels of metabolites.

44 Nitrogen is a key element of proteins and nucleic acids and is thus crucial for crop growth and  
45 development. Improvement of Nitrogen use efficiency is a concern in high input agriculture to reduce  
46 nitrogen loss and the associated environmental damages and economic losses (Raun and Johnson, 1999)  
47 as well as in low input agriculture to increase crop protein content and yields (Dawson et al., 2008). NUE

48 is a complex quantitative trait involving N uptake, translocation, assimilation, and remobilization all  
49 interacting with environmental factors. A lot of genes involved at each step of NUE have been  
50 characterized in rice (Li et al., 2017). Some of these genes may contribute to the genetic variability of  
51 NUE. For example the variation of nitrate transporter gene NRT1.1B between indica and japonica is  
52 associated to enhanced nitrogen uptake and root-to-shoot transport. The transfer of NRT1.1B-indica into  
53 a wide range of japonica backgrounds has confirmed the interest of this gene for crop breeding (Hu et al.,  
54 2015). However, for breeding purposes, there is still a need to identify alleles that most contribute to the  
55 existing genetic variability observed for NUE and its components among rice genetic resources. Few QTL  
56 mapping studies have been performed in rice for NUE related traits.

57 The first study by Obara et al. (2001) reported seven QTLs associated with the content of  
58 Glutamine Synthetase 1 (GS1) and six QTLs associated with NADH-GOGAT protein content in a set of  
59 backcrossed inbred lines between Nipponbare/Kasalath. Some of those QTLs colocalized with  
60 physiological traits related to nitrogen recycling during senescence. Shan et al. (2005) detected QTL for  
61 nitrogen concentration of grain, straw and shoot and one QTL for NUE on chromosome 6 in a RIL  
62 population of Zhenshan97/Minghui63. Cho et al. (2007) identified one main effect QTL for NUE on  
63 chromosome 9 under low N using a RIL population of Dasanbyeo/TR22183. Screening a doubled haploid  
64 population from IR64 and Azucena at three N levels, Senthilvel et al. (2008) identified one QTL on  
65 chromosome 3 associated with NUE and plant yield. By using two different RIL populations, Li et al.,  
66 2010, could identify two chromosome intervals stably detected across genetic backgrounds but most of  
67 the QTL were detected in only one background. Wei et al. (2011) reported a total of 10 QTLs for NUE  
68 in two separate experiments on chromosomes 1, 2, 6, 7 and 11 in the RILs population of Zhenshan  
69 97/Minghui 63. In 2012, Wei et al., continued the study with the same RILs population and reported 11  
70 QTLs for NUE and 15 QTLs for N-deficiency tolerance traits among which 4 QTL on chromosome 1,  
71 3, 4 and 7 were common for these two traits. Lastly, Zhou et al. (2017) evaluated 128 CSSLs between  
72 recipient 9311 and donor nipponbare under hydroponic culture to evaluate nitrogen uptake and nitrogen  
73 use efficiency. They identified a total of 13 QTL associated with these two traits.

74 To our knowledge, only one genome wide association study (GWAS) has been performed in rice to  
75 address NUE related traits (Liu et al., 2016). However these traits (plant height, tiller number and grain  
76 length measured under low and normal N conditions) did not consider N content in the different plant  
77 compartment and therefore did not address NUE as such. Moreover the 184 rice varieties of this study  
78 were genotyped at low density with 157 SSR markers. Here we present, a genome wide association study  
79 of NUE and NUE related traits performed on a worldwide population of 190 cultivars mainly of tropical  
80 japonica background using 38390 SNPs. The varieties have been evaluated for 16 traits related to NUE  
81 and yield components under upland conditions at two contrasted level of nitrogen input and during two  
82 consecutive cropping seasons.

### 83 **III.1. Material and method**

#### 84 **III.1. 1. Plant material**

85 A panel of 198 upland rice accessions was used in this study. These materials are used in the  
86 breeding program conducted in Madagascar by FOFIFA and CIRAD and they originate from different  
87 breeding programs: CIAT in Colombia, IAC and EMBRAPA in Brazil, FOFIFA/CIRAD in  
88 Madagascar, CIRAD in Brazil and Africa Rice in Ivory Coast (Annexe 3). All the varieties included  
89 in the panel have first been screened for their adaptation to upland conditions in the mid-west of  
90 Madagascar in order to check that they were able to complete their reproduction cycle and not too  
91 susceptible to blast disease.

#### 92 **III.1.2. Field experimental design and crop management**

93 The field trials were conducted at Ivory, in the mid-west of Madagascar (19°33'27 S, 46°24'43 E,  
 94 960 m asl) over two cropping seasons (2014-2015 and 2015-2016). In each year, the experimental design  
 95 was an alpha lattice with two replications. Each replication contained 14 blocks. Each block was split into  
 96 two sub-blocks in order to evaluate two mineral nitrogen fertilization level: low nitrogen (LN, 0 kg ha<sup>-1</sup>  
 97 <sup>1</sup>N) and high nitrogen (HN, 120 kg ha<sup>-1</sup>N). Each block also comprised 14 varieties and 2 repeated control  
 98 varieties. Thus, each variety plot was split in two adjacent subplots, one at HN and the other at LN (Figure  
 99 19). The size of elementary plots (corresponding to the combination of one variety and one N level) was  
 100 1.8 m × 2.4 m (108 hills) and 1.4 m × 2 m (70 hills) in replications 1 and 2 respectively in 2014-2015, 1.8  
 101 m × 1.6 m (72 hills) and 1.2 m × 1.6 m (48 hills) in replications 1 and 2 respectively in 2015-2016.

102 Field preparation for the rice crop started with ox plowing followed by hand surfacing of the soil.  
 103 Four to six rice seeds were sown per hill with 20 cm×20 cm spacing. Right before sowing, the same base  
 104 dressing of cattle manure (5 000 kg ha<sup>-1</sup>), triple superphosphate (69 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), potassium sulfate (62.4  
 105 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O) and dolomite (500 kg ha<sup>-1</sup>) was applied to each hill in all the plots. In the HN plots, nitrogen  
 106 was applied in the form of urea (46% N) at the rate of 120 kg ha<sup>-1</sup> split into three equal applications around  
 107 the emergence stage, tillering stage and booting stage. To protect the crop from white grubs (the larval  
 108 stage of scarab beetles) and adult black beetles that feed on rice roots, the rice seeds were treated with an  
 109 insecticide (35% imidacloprid +10% thiram, at 2.5 g kg<sup>-1</sup> of seeds) before sowing. The rice crop was  
 110 hand-weeded whenever needed. Fungicides have been applied twice a week to protect the crop from rice  
 111 blast disease starting from the apparition of the first blast lesions up to harvest, alternatively using  
 112 carbendazime and propineb.

### 113 III.1.3. Measurement of phenotypic traits

114 A total of 21 traits were measured in the panel in each elementary plot of each season (Tableau  
 115 15). The number of days to flowering (DTFL) was recorded at the 50% flowering stage, i.e. when the  
 116 anthers are extruded from the spikelets in 50% of the plants in each plot. At maturity, six hills (0.24 m<sup>2</sup>)  
 117 in the middle of each plot were measured for plant height (PH). Then whole the plants from the six hills  
 118 were uprooted, their roots cut to keep only the aboveground biomass. Plants were separated into straw  
 119 and panicles. The panicles were counted, hand threshed and filled spikelets were separated from unfilled  
 120 spikelets. The dry weight of filled spikelets and unfilled spikelets was determined after oven drying at 60  
 121 °C for 72 h. Filled spikelets were used to estimate grain yield (GY). Two sub-samples of 200 filled  
 122 spikelets and 200 unfilled spikelets were weighed to calculate the total number of filled and unfilled  
 123 spikelets and 1 000-grain weight (TGW). The number of panicles per m<sup>2</sup> (PANM2), the number of  
 124 spikelets per panicle (SPIPAN) and the percentage of filled grains (FG) were calculated. Straw samples  
 125 were oven dried at 60 °C for 72 h and weighed to estimate straw yield (SY). The harvest index (HI) was  
 126 then calculated from GY and SY. The concentration of N of filled grain (GNC) and straw (SNC) was  
 127 measured by near-infrared spectroscopy (NIRS) on dried samples (oven-dried at 60 °C for 72 h), ground  
 128 to 1 mm, using available calibration equations (Rakotoson *et al.*, 2017; Annexe 1, Fig.2). Total nitrogen  
 129 uptake (TNUP) was calculated as (GY × GNC/100) + (SY × SNC/100) and nitrogen harvest index (NHI)  
 130 as GY × GNC/ (100 × TNUP). According to Moll *et al.* (1982), nitrogen use efficiency (NUE) was  
 131 estimated as GY/N supply and its components nitrogen uptake efficiency (NUPE) as TNUP/ N supply,  
 132 and nitrogen utilization efficiency (NUTE) as GY/TNUP. In the LN treatment, soil N supply was  
 133 estimated as the maximum amount of plant N uptake, among all individual plots of a given block in LN.  
 134 In the HN treatment, it was calculated as the sum of soil N supply of the corresponding block in LN plus  
 135 the amount of inorganic N applied. During post-recolt, five traits related to grain morphology were  
 136 measured either quantitatively for grain length (GL), grain width (GW), grain thickness (GT) or  
 137 qualitatively, using a 1-9 scale, for grain pilosity (GP; 1 glabrous to 9 very hairy) and awn length (AL; 1  
 138 absence of awn to 9 very long awn). GL, GW, GP and AL traits have been used to validate the association  
 139 mapping approach in our panel.

### 140 III.1.4. Phenotypic data analysis

141 An analysis of variance was conducted using a mixed model considering year, nitrogen,  
 142 replication and block as fixed effects and genotype, genotype x year, genotype x nitrogen, genotype x  
 143 nitrogen x year and nitrogen x block as random effects using the PROC Mixed procedure of the  
 144 SAS/STAT statistical analysis package (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The values of  
 145 best linear unbiased predictor (BLUPs) were calculated for each genotype and for genotype x nitrogen  
 146 interaction. Given the existence of interaction with year, another analysis was conducted by year and  
 147 BLUPs were also calculated for each genotype and for genotype x nitrogen interaction. All these  
 148 BLUPs have been used for the association analyses. Broad-sense heritability ( $H^2$ ) for all traits were  
 149 calculated from variance components obtained using the REML option of SAS PROC  
 150 VARCOMP. The distribution of each trait for each nitrogen level were drawn using the ggplot R  
 151 package.

### 152 III.1.5. Genotyping

153 Seeds of 190 accessions were cultivated at the Cirad Montpellier laboratory for DNA extraction  
 154 and genotyping. Genomic DNA was extracted from the leaf tissue of a single plant of each accession  
 155 using the MATAB method described in Risterucci et al. (2000) and then diluted to 100 ng/ $\mu$ l. Each DNA  
 156 sample was separately digested with the restriction enzyme ApeKI. Each library was single-end sequenced  
 157 in a single-flow cell channel (i.e., 96-plex sequencing) (Elshire et al. 2011) using an Illumina  
 158 HiSeq™2000 (Illumina, Inc.). Libraries sequence reads were aligned to the rice reference genome (Os-  
 159 Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 (Kawahara et al. 2013) with Bowtie2 (Default parameters). Single  
 160 nucleotide polymorphism (SNP) calling was performed using the Tassel GBS pipeline v5.2.37 (Default  
 161 parameters) (Glaubitz et al. 2014). Markers with a call rate below 80%, a heterozygosity rate above 20%  
 162 or a minor allele frequency (MAF) < 2.5% were discarded. The remaining heterozygotes were converted  
 163 to missing data. The missing data were imputed using Beagle v4.0 (Browning and Browning, 2007). After  
 164 imputation, markers with a MAF < 4.2% (8 out of 190) were discarded. The final resulting matrix involved  
 165 190 individuals and 38390 SNP markers.

### 166 III.1.6. Genetic diversity structure and linkage disequilibrium analysis

167 The analysis of the population structure was performed using DARwin 6.0.14 (Perrier and  
 168 Jacquemoud-Collet, 2006). We calculated simple matching genetic dissimilarities between all pairwise  
 169 combinations of accessions. The matrix of pairwise dissimilarities was then used to build the Neighbour  
 170 Joining (N-J) trees. The analysis was first performed on the 190 accessions of the panel using the totality  
 171 of the 38390 SNP markers. Another analysis was performed by merging our panel of 190 accessions with  
 172 the worldwide panel of the 3K Rice Genomes Project (Li et al., 2014). The analysis was performed using  
 173 27326 SNP markers in common between the 3K project data set and our own data set. We used Tassel  
 174 5.2.31 software to calculate Linkage disequilibrium (LD). The pairwise linkage disequilibrium (LD)  
 175 among SNPs belonging to a same chromosome was estimated as  $r^2$ :

$$r^2(p_A, p_B, p_{AB}) = \frac{D^2}{p_A(1-p_A)p_B(1-p_B)}$$

176 Where  $p_{AB}$ ,  $p_A$  and  $p_B$  are the frequencies of the AB haplotype and of alleles A and B at two SNP loci,  
 177 and  $D^2 = (p_{AB} - p_A p_B)^2$  is the squared difference between observed and expected haplotype frequencies  
 178 (Van Liere and Rosenberg, 2008). Local LD between SNPs within genomic regions containing candidate  
 179 genes was visualized using LD heatmap R package (Shin et al., 2006). LD values have also been used to  
 180 regroup SNP markers significantly associated to the different traits into haplotypes. In the result table, all  
 181 SNP marker pairs with LD P-Value < 0.0001 were gathered into a same haplotype group.  
 182

### 183 III.1.7. Association analysis



184 We used Tassel 5.2.31 software to perform association analysis (Bradbury et al., 2007), using the  
 185 mixed linear model (MLM) with control of population structure (Q) and kinship (K) to avoid spurious  
 186 associations (Yu et al., 2006; Zhang et al., 2010). The structure was taken into account through a principal  
 187 component analysis (PCA) of the genotypic data (Price et al. 2006) computed with Tassel. We retained  
 188 the first five principal components to build the Q matrix. The kinship matrix was also computed with  
 189 Tassel using the centered\_IBS method. The mixed model analysis was conducted with optimum  
 190 compression option and P3D option for variance component estimation. The association analyses were  
 191 performed in each year and across the two years using average BLUP values of genotypes and BLUP  
 192 values of genotypes in HN and LN conditions to take into account interaction with year and nitrogen  
 193 conditions (9 association analyses per marker-trait combination). The maximum value of  $-\text{Log}(P)$  among  
 194 these 9 analyses was considered to retain significant marker-trait associations. The threshold for further  
 195 results presentation and discussion was set at  $-\log_{10}(P) = 4$ . The q-value estimating the false discovery  
 196 rate was also computed using the q-value R package (Storey and Tibshirani, 2003).

## 197 **III.2. Results and discussions**

### 198 **III.2.1. Field phenotypic evaluation of NUE and related agronomic traits**

199 The results of the analysis of variance (Tableau 10) across two years showed a significant effect  
 200 of genotype for all traits. A significant interaction was observed between Year and genotype for all  
 201 measured traits except for GNC. A significant interaction was also observed between Year and N level  
 202 for all measured traits except for GP and GL. Given these interactions, the analysis of variance was also  
 203 performed for each year separately. GWAS analysis were runned using genotype blups calculated over  
 204 years and over years for each N level as well as genotype blups calculated for each year and for each year  
 205 and each N conditions. The traits heritabilities did not change much between the two nitrogen levels. SY,  
 206 SNC, TNUP and NUPE were the traits presenting the lowest heritabilities (Tableau 11). The distributions  
 207 of the phenotypic classes are presented (Annexe 4).

### 208 **III.2.2. Genetic diversity structure and extent of linkage disequilibrium in the panel**

209 The genetic relationship between the 190 varieties of our panel and the worldwide genetic  
 210 diversity from the 3k genome project is presented in the neighbour joining tree (Figure 30). The great  
 211 majority of the varieties of our panel are related to the japonica subspecies and most of them to the tropical  
 212 and subtropical group of the japonica subspecies with only one related to the temperate japonica group.  
 213 Only two varieties are clearly related to the indica subspecies. Around thirty varieties out of the 190  
 214 varieties in the panel present a variable level of admixture between the indica and the japonica subspecies.  
 215 The NJ tree involving only the 190 varieties of our panel is presented in supplementary (Annexe 5). The  
 216 low level of genetic structuration in the panel is confirmed with the differentiation of only the few varieties  
 217 with a strong indica background. Clustering of varieties is mainly due to kinship relationship for varieties  
 218 sharing partly or totally the same parents. Consequently, the varieties originating from a same breeding  
 219 program tend to gather together (Annexe 5).

220 On average across all chromosomes, LD reached half of its original value at around 300 Kb in the  
 221 panel of 190 varieties used in this study compared to less than 200 kb in a reference worldwide panel of  
 222 tropical japonica varieties (Raboin et al., 2016). LD dropped to an  $r^2$  value of 0.2 within 1000 kb in our  
 223 panel and 400 kb in the reference panel (Figure 31). LD was strong in our panel in comparison to the  
 224 reference japonica panel. In this study, we used 38390 SNP markers representing an average distance  
 225 between adjacent markers of 11 kb which was far below LD decay. The marker density used for different  
 226 GWAS in rice ranged from 0.06 to 325.10 kb (Zhang et al., 2016). Given the extent of linkage  
 227 disequilibrium, the genome coverage should be suitable for the detection of most interesting marker-trait  
 228 associations through GWAS but with a rather low resolution power. Yano et al. (2016) using a panel,  
 229 comparable in size to ours, of 176 temperate japonica accessions with a high extent of LD (445 kb) were

230 able to identify new genes influencing agronomic traits but they used a higher marker density (over 400  
231 k SNP) which improve the power of GWAS (Gordon and Finch, 2005).

### 232 **III.2.3. Validation and accuracy of the GWAS approach in our panel through the analysis** 233 **of marker-traits associations at four known gene loci (GW5, GS3, Awn1 and Glabrous 1)**

234 To assess the potential of our GWAS experiment to identify causative genes of measured  
235 polymorphism, we performed GWAS on simple morphological traits of the grain: awn length (AL), grain  
236 pilosity (GP), grain length (GL) and grain width (GW). GWAS allowed us to detect association signals  
237 located in the vicinity of previously identified genes involved in the polymorphism of four grain  
238 morphological traits: GW5 (Shomura et al., 2008), GS3 (Fan et al., 2006), Awn1 (Luo et al., 2013) and  
239 Glabrous 1 (Angeles-Shim et al., 2012).

240 For awn length (AL), we detected 63 significant SNP on chromosome 4 and 11 at  $p < 10^{-4}$ . A region  
241 on chromosome 4 revealed strong association signals surrounding Awn1, a gene controlling awn  
242 elongation in rice. It represents a large chromosome segment of over 4 MB (Figure 32). The distance  
243 between Awn1 gene (Os04g28280; Chr4\_16732393) and the most significant SNP (Chr4\_17466245)  
244 detected at  $-\log P = 7.3$  was 733 kb.

245 For grain pilosity (GP), a region was identified on chromosome 5 encompassing 44 significant  
246 SNP at  $p < 10^{-4}$  over 600 kb. This region includes the position of Glabrous 1 (Os05g0118700;  
247 Chr5\_977812), a gene involved in glabrousness of rice glumes. The most significant SNP  
248 (Chr5\_1061537) detected at  $-\log P = 8.5$  was located at 83kb (Figure 33) from glabrous 1.

249 For grain length (GL), one region identified on chromosome 3 coincide with GS3 a previously  
250 identified gene involved in grain size (Figure 34). The most significant SNP (Chr3\_16790082) was  
251 mapped close to GS3 (Os03g29350; Chr3\_16695922). It was detected at  $-\log P = 6.17$ , was located at 94  
252 kb from GS3 and explained 13% of total phenotypic variation of grain length (Tableau 17).

253 For grain width (GW), a region on chromosome 5 revealed strong association signals surrounding  
254 GW5, a gene involved in grain size (Figure 34). The most significant SNP (Chr5\_5391748) detected at  
255  $-\log P = 6.4$  was located at 26 kb from GW5 (Os05g09520; Chr5\_5365520) and explained 11.7 % of total  
256 phenotypic variation of grain width (Tableau 16). I

257 Marker-trait association have been detected close to four known genes previously characterized  
258 using mutants or fine mapping. However, the fine analysis of these association signals revealed a fluctuant  
259 resolution depending on local LD. The distance between the peak signals and the putative causative genes  
260 varied between 26kb and 733kb. This level of accuracy makes it difficult to unequivocally identify  
261 causative genes associated to the detected signals. In only one case, for GW, we could detect a significant  
262 marker, although not the most significant one, that was localized within the known gene GW5.

### 263 **III.2.4. Genome wide association study of NUE and related agronomic traits**

264 A total of 306 significant SNPs associated with the 21 agronomic traits we measured, were  
265 harvested from the GWAS analysis at  $p = 10^{-4}$  threshold (Tableau 16).). Those significant SNP-trait  
266 associations correspond to 47 haplotypic regions (when regrouping markers in strong LD) and 29 isolated  
267 SNP markers scattered over all 12 chromosomes. 180 of these SNPs were located in putative genes (MSU  
268 rice genome annotation project release 7), however only those that could be of relevance for the trait  
269 analysed, from our viewpoint, have been presented in tableau 16. Accessions were evaluated under two  
270 nitrogen level (HN and LN) and 40 significant SNPs were detected specially under HN treatment, 59  
271 under LN treatment and 209 significant SNPs (68%) were detected both under HN and LN treatment  
272 (data not shown).

#### 273 ***Grain Yield, grain yield components and other agronomic traits***

274 Days to flowering (DTFL), was found associated with a total of 12 SNPs at  $p < 10^{-4}$ . Those  
275 associations correspond to 4 haplotypic regions on chromosomes 1, 2 and 3 and one isolated marker on  
276 chromosome 3. One of these regions on chromosome 3 revealed the strongest association signal of our

277 study ( $-\log P = 8.81$  at Chr3\_1424348) and corresponds to a major effect explaining up to 21.8% of the  
278 phenotypic variation of the trait.

279 Yield can be dissected into four components: panicle per m<sup>2</sup> (PANM2), spikelet per panicle  
280 (SPIPAN), filled grain (FG) and thousand grain weight (TGW). For PANM2, 57 SNPs were found  
281 significant at  $p < 10^{-4}$ . Those associations correspond to three haplotypic regions and two isolated markers.  
282 One haplotypic region on chromosome 4 encompasses 53 SNP markers out of 57 and a large chromosome  
283 segment of 2.2 Mb. The most significant association within this segment was located at Chr4\_31359978  
284 and explained 12% of PANM2 variation. For SPIPAN, only 3 SNPs were found significantly associated  
285 on chromosomes 2, 4 and 12. For FG, 18 SNPs have been detected on chromosomes 1, 2, 3, 4, 9 and 11  
286 corresponding to seven haplotype groups and 2 isolated markers. For TGW, 26 significant SNPs were  
287 found significantly associated. Those associations correspond to 7 haplotypic regions and one isolated  
288 marker on chromosomes 2, 3, 6, 10, 11 and 12. The association signals detected for TGW on chromosome  
289 3 (the highest peak Chr3\_16790082 was detected at  $-\log P = 6.17$ ) colocalized with association signals  
290 detected for GL and with GS3 a previously identified gene involved in grain size as already discussed in  
291 the preceding part. Although a total of 104 marker-trait associations have been revealed through GWAS  
292 for the four yield components, only four SNPs were found significantly associated with yield as such.  
293 They belong to two haplotype groups on chromosome 6 and 11. Three grain size traits that could be  
294 related to TGW have also been studied. For grain length (GL), 28 marker trait associations have been  
295 detected belonging to 4 haplotype groups and three isolated markers on chromosomes 2, 3, 4, 9 and 12.  
296 One of these groups on chromosome 3 is closely associated with GS3 as discussed above. For grain width  
297 (GW), 27 SNP have been detected corresponding to six haplotype groups and one isolated marker on  
298 chromosomes 2, 5, 6 and 12. One of these groups on chromosome 5 is closely associated with GW5 as  
299 discussed above. Finally, for grain thickness, we detected ten marker-trait association corresponding to  
300 two haplotype groups and one isolated marker on chromosomes 1, 3 and 12.

301 Two indicators of vegetative biomass have been studied: straw yield (SY) and plant height (PH).  
302 SY was significantly associated with 9 SNP markers belonging to four haplotype groups and one isolated  
303 marker. They are located on chromosomes 1, 2, 8 and 11. For PH, 24 SNP markers have been detected  
304 belonging to 8 haplotype groups and one isolated marker on chromosomes 3,4,5,7 and 10. For harvest  
305 index (HI), which measures the partition between vegetative and grain biomass, 49 significant association  
306 signals were detected belonging to 12 haplotype groups and 6 isolated markers on chromosomes 1, 3, 4,  
307 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11.

### 308 *Nitrogen Use Efficiency (NUE), NUE components and N-related traits,*

309 NUE can be decomposed into Nitrogen Uptake Efficiency (NUPE) and Nitrogen Utilization  
310 Efficiency (NUTE). For NUPE, 5 significant SNPs were identified belonging to two haplotype groups on  
311 chromosome 5 and 6. For NUTE, 28 SNPs have been detected belonging to 10 haplotype groups and one  
312 isolated marker on chromosome 1, 3, 4, 6, 9, 10 and 11. However, only four SNP markers have been  
313 detected for NUE belonging to two haplotype groups and one isolated marker on chromosomes 6, 7 and  
314 11. The other four nitrogen-related traits we studied, were straw N content (SNC), grain N content (GNC),  
315 nitrogen harvest index (NHI) and total N plant (TNUP). For SNC, only two SNP have been detected one  
316 belonging to a haplotype group on chromosome 1 and the other one was isolated on 9. For GNC, 26 SNPs  
317 have been detected belonging to five haplotype groups and four isolated markers on chromosomes 1, 4,  
318 5, 10, 11 and 12. For NHI, 31 SNPs have been detected belonging to 9 haplotype groups and three isolated  
319 markers on chromosomes 1, 4, 5, 6, 9, 11 and 12. For TNUP, 10 SNPs have been identified belonging to  
320 three haplotype groups on chromosomes 1, 5 and 6.

### 321 **III.2.5. Coincidence between haplotype groups (QTLs) associated to different traits**

322 Coincidences between SNP detected for different traits have been synthetized in table 16. Some  
323 of these coincidences are rather straightforward like the colocalization of association signals for HI and  
324 NHI within 6 haplotype groups (21 significant SNPs in common). Association signals for NUTE and HI

325 (or NHI) colocalized within four haplotype groups (6 significant SNPs in common) confirming at the  
 326 genetic level the strong phenotypic correlation observed between NUE and HI (Rakotoson et al., 2017).  
 327 Association signals for NUTE and FG colocalized within four haplotype groups. DTFL and FG also  
 328 colocalized within four haplotype groups. This is partly a transitive relationship because late varieties  
 329 (DTFL) often present a lower fertility (FG) which in turn may induce lower NUTE. DTFL, NUTE and  
 330 FG colocalized within two haplotype groups. We also identified three common haplotypes for NUTE and  
 331 GNC (13 significant SNP in common). For TGW we identified one occurrence of colocalization with a  
 332 GW haplotype and two occurrences for TGW and GL. Because of the very low number of SNP detected  
 333 for complex quantitative traits like GY and NUE by comparison to the number of SNP detected for their  
 334 component traits, we could not identify a lot of coincidences between haplotypes identified for these traits  
 335 and those identified for their components. This confirms the interest to decompose complex traits into  
 336 simpler and more heritable component traits. For NUE nevertheless we found one occurrence of  
 337 colocalization with a NUPE haplotype and two occurrences for NUE and NUTE. However, we found no  
 338 coincidence between haplotypes identified for NUTE and for NUPE neither common detected SNP. This  
 339 is in line with the absence of significant phenotypic correlation between NUPE and NUTE either under  
 340 low or under high N revealed in Rakotoson et al. (2017) and suggest that their genetic control is mostly  
 341 independent. We found no coincidence between haplotypes identified for PH and for SY neither common  
 342 detected SNP. Three interesting haplotypes should be highlighted that seem to present pleiotropic effects.  
 343 One is located on chromosome 1 (2958149- 4958939) and encompasses significant marker-trait  
 344 associations detected for DTFL, NHI, HI, FG, SY and NUTE. The second one is located on chromosome  
 345 6 (21460579- 27015435) and encompasses marker-trait associations detected for GY, NUE, HI, TNUP,  
 346 NUPE, PANM2. The third one is located on chromosome 11 (19200467- 22302701) and encompasses  
 347 marker-trait associations detected for GY, NUE, NUTE, NHI, HI, GNC. The only four signals detected  
 348 for GY are located within two of these pleiotropic haplotypes on chromosome 6 and 11.

### 349 **III.2.6.Candidate genes identification**

350 Single SNP detected on chromosome 11 (Chr11\_ 19200467) was associated with GY, HI, NHI,  
 351 NUTE and was found on 15 kb from the *tld1-D* gene (gene responsible of tillering dwarf, leaf angle and  
 352 drought tolerance) (Tableau 17). On chromosome 1, there was one SNP (Chr1\_29135405) which was on  
 353 53 kb from the known gene nitrate transporter *OsNRT2.3a* (Os01g50820), involved in the nitrogen  
 354 metabolism. This SNP was also associated with GNC, one of the component traits of NUTE.  
 355 The position of the 2 of the 5 SNPs coincided with the annotated gene, respectively, Os01g06220 and  
 356 Os01g06230 and were associated also with many traits as NHI, HI, FG. The single SNP on chromosome  
 357 2 (Chr2\_ 2843055) were on 38 kb from the annotated gene *OsVIL2* (Os01g05840), which was responsible  
 358 of the flowering time in rice. The first top peak (Chr3\_1352456) were located on 82 kb from the known  
 359 gene *DTH3* (days to heading, Os03g03070) and explained 19.9% of the phenotypic variance (Table 17).  
 360 Single SNP association, on each on chromosome 1 (Chr1\_3028472) and 3 (Chr3\_1395165) were found  
 361 close (respectively on 43 kb and 10 kb) to two subfamily of the *TKL\_IRAK\_CrRLK1L-1* gene. This gene  
 362 family seems to be involve in many traits because these two SNPs were also associated with HI, NHI,  
 363 SY, FG and NUTE (Tableau 17).

364 We observed that among the 12 significant SNPs associated with days to flowering (DTFL), 6  
 365 SNP co-localized with several agronomic traits as nitrogen harvest index (NHI), harvest index (HI), filled  
 366 grain (FG), straw yield (SY) and nitrogen utilization efficiency (NUTE). It suggest that some maturity  
 367 genes may have significant impact on yield component and the nitrogen use efficiency.  
 368 Flowering time is a complex and important trait determining the adaptation of a genotype to its  
 369 environment. In this study, we identified four haplotype groups associated with DTFL on chromosome 1,  
 370 2 and 3. . One of these haplotypes present a major effect on DTFL explaining up to 22% of the trait  
 371 phenotypic variation. A close physical proximity of 82 kb was observed between one SNP  
 372 (Chr3\_1352456) of this haplotype and *DTH3*, a known gene for heading date (Os03g03070,

373 Chr3\_1269856, Lee et al., 2004). This SNP was highly significant at (-log P=8.15). However, a tighter  
 374 (10kb) and stronger (-logP=8.84) association was also detected within this haplotype between SNP  
 375 (Chr3\_1395165) and another interesting candidate gene TKL\_IRAK\_CrRLK1L-1.6 (Os03g03280). It is  
 376 noteworthy that another identified haplotype for DTFL on chromosome 1 also highlights a candidate gene  
 377 of the same family (Os01g06280, TKL\_IRAK\_CrRLK1L-1.4) that is located between two detected SNP  
 378 (Chr1\_2972304 at 13 kb from the gene and Chr1\_3028472 at 43 kb from the gene). The receptor kinase  
 379 *CrRLK1L* gene (*Catharanthus roseus* receptor like kinase) has proved to be involved in many biological  
 380 process, In Arabidopsis, CURVY1 a gene from the *CrRLK1L* family is involved in flowering time  
 381 (Gachomo et al; 2014). In *Oryza sativa* Phylogenomic identified 16 *CrRLK1L* homologs with Gigantea-  
 382 mediated circadian regulation of their expression (Nguyen et al., 2014). They propose a functional model  
 383 for the role of *OsCrRLK1L2* in regulating the flowering time signaling pathway or circadian rhythms.  
 384 Three other detected SNP associated with DTFL were located close to candidate genes involved in  
 385 flowering control: Chr2\_2843055 at 38kb from *OsVIL2* (Os02g05840; Yang et al., 2013), Chr3\_1352456  
 386 at 82 kb from *DTH3* (Os03g03070; Lee et al., 2004) and Chr\_3845920 at 47 kb from *OsSUT1*  
 387 (Os03g07480; Takeda et al., 2001). Several studies reported that the circadian clock of rice controlled  
 388 key development process such as flowering time (Yano et al., 2000; Izawa, 2012).

389 For NUE related traits, we identified a limited number of candidate genes given the primary  
 390 objectives of our study. Two high affinity nitrate transporter genes were found close to SNP associated  
 391 with grain N content (GNC) on chromosome 1. *OsNRT2.1* (Chr1\_634328, Os01g02170; Yan et al., 2011)  
 392 was located at 39 kb from the SNP Chr1\_594602. *OsNRT2.3a* (Chr1\_29188984, Os01g50820; Tang et  
 393 al., 2012) was located at 23 kb from the SNP Chr1\_29212814. Chr1\_29135405, the next closer SNP  
 394 marker to *OsNRT2.3a* (at 53kb) was associated both to GNC and NUTE. GNC (Tableau 17). Moreover,  
 395 *OsNRT2.1* have been identified as improving NUE (Chen et al., 2016). The overexpression of  
 396 *OsNRT2.3b* has been demonstrated to improve yield and NUE (Fan et al., 2016).

397 A few genes associated to nitrogen remobilisation have also been located close to SNP markers  
 398 associated to NUE related traits like NHI, NUTE and SNC. *OsDOS* (Os01g09620; Kong et al., 2006)  
 399 involved in delaying leaf senescence in rice was located at 10 kb from SNP chr1\_4958939 associated to  
 400 NHI. *Nyc1* (Os01g12710; Kusaba et al., 2007) involved in chlorophyll degradation during senescence  
 401 was located at 284 kb from SNP chr1\_7309207 associated with SNC. *OsRBCS2* (Os12g17600; Ogawa  
 402 et al., 2011) involved in rubisco content was located at 166 kb from SNP Chr12\_9914173 associated to  
 403 NHI. Another putative gene, *Os11g32770*, annotated “ribulose biphosphate carboxylase large chain  
 404 precursor”, was located at 7 kb from SNP Chr11\_19365597 associated to NHI, NUTE and HI. Rubisco  
 405 is the main source of N from leaves during the remobilisation process.

406 A few candidate genes for the percentage of filled grain (FG) can be proposed. *Os01g12420*, a  
 407 receptor-like kinase contains one SNP associated to FG. This is a gene of the same family than crinky4  
 408 (Pu et al., 2012) required to maintain the interlocking of the palea and lemma, and fertility in rice.  
 409 *Os02g12550* a putative gene encoding cytochrome P450 contains 5 SNP associated with FG (6559647,  
 410 6559650, 6559652, 6559654, 6559655 on chromosome 2). The cytochrome P450 is similar to *CYP70A3*  
 411 (Yang et al., 2018) essential for the development of anther cuticle and pollen exine whom mutation can  
 412 provoke no-pollen male-sterility phenotype. *PTC1* (Os09g27620; Li et al., 2011) a gene involved in  
 413 tapetal cell death and pollen development was located at 180 kb of SNP chr9\_16968338 associated to FG.

414 For grain size traits, a total of seven distinct candidate genes can be proposed including the already  
 415 discussed *GS3* and *GW5*. *OsMPS* (Os02g40530, Schmidt et al., 2013) was located at 71 kb from SNP  
 416 chr2\_24510877 associated with *TGW*. Two candidate genes correspond to proteins of the IQ calmodulin-  
 417 binding motif family like *GW5*: *Os03g23960* contains SNP chr3\_13604676 associated to *GT* and  
 418 *Os11g31060* is located at 5 kb from SNP chr11\_18075204 associated to *TGW*. *Os03g26910* a putative  
 419 uncharacterized glycosyl hydrolase like *GIF1* (Wang et al., 2008) a domestication gene involved in rice  
 420 grain filling was located at 7 kb from SNP Chr3\_15389524 associated to *GL*. Finally, *GS5*, a gene

421 regulating grain size (Os05g06660; Li et al., 2011) was located at 67 kb from SNP chr5\_3506138  
422 associated to GW.

423 For the three interesting haplotypes presenting pleiotropic effects on chromosome 1, 6 and 11,  
424 some candidate genes can be highlighted. Within the first haplotype on chromosome 1(2958149-  
425 4958939), Os01g06220 a gibberellin receptor contains SNP chr1\_2958149 associated to DTFL, NHI and  
426 HI and next to it Os01g06230 a member of the gene family auxin-responsive SAUR contains SNP chr1\_  
427 2961416 associated to FG, DTFL, NHI and HI. Moreover, within this same haplotype we also find  
428 Os01g06280 a CrRLK1L receptor kinase we already discussed for its putative involvement in flowering  
429 time control. Within the second haplotype on chromosome 6 (21460579- 27015435), a single candidate  
430 gene d35 (Os06g37300; Itoh et al., 2004) can be proposed corresponding to gibberellin biosynthesis  
431 enzyme whom defect induces a semi-dwarf stature. This gene is located at 7 kb from SNP Chr6\_  
432 22028211 associated to TNUP. Within the third haplotype on chromosome 11 (19200467- 22302701),  
433 tld1-D a gene involved in auxin synthesis whom mutation induces increased number of tillers and  
434 dwarfism ( Os11g32510, Zhang et al., 2009) is located at 16 kb from SNP chr11\_19200467 associated to  
435 GY, NUE, NUTE, NHI and HI. Close to it within the same haplotype, there is Os11g32770 a candidate  
436 gene already discussed above for its putative role in N remobilisation is located at 7kb from SNP chr11\_  
437 19365597 associated to NUTE, NHI and HI .

### 438 **Conclusion**

439 The present study demonstrated the potential of GWAS to identify candidate gene and new loci  
440 associated with agronomic trait. We have detected 306 SNPs ( $-\log P > 4$ ) for 21 agronomic traits. Among  
441 the 36 loci associated with NUE and its components (NUPE, NUTE), 29 co-localized with many traits as  
442 HI, NHI, GNC, FG, TNUP, DTFL. For NUE, one of the 4 novel loci associated with NUE affected  
443 multiple traits and needed a deep genetic investigation.

**Annexe 8: Résumé de la communication orale au Forum de la Recherche, 5<sup>ème</sup> édition, 29-30 novembre 2017, Fianarantsoa - Madagascar**

**Analyse génétique de l'efficacité de l'utilisation de l'azote chez le riz pluvial**

RAKOTOSON Tatiana<sup>1</sup>, DUSSERRE Julie<sup>2</sup>, RAMONTA RATSIMIALA Isabelle<sup>4</sup>, RAKOTOARISOA Noronirina Victorine<sup>4</sup>, RAMANANTSOANIRINA Alain<sup>1</sup>, AHMADI Nourollah<sup>3</sup>, VOM BROCKE Kirsten<sup>5</sup>, RABOIN Louis Marie<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FOFIFA - SRR Antsirabe, BP 230, Antsirabe 110, Madagascar.

<sup>2</sup> CIRAD Montpellier – UPR AIDA, TA B-115, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France.

<sup>3</sup> CIRAD Montpellier – UMR AGAP, TA A-108, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France

<sup>4</sup> Université d'Antananarivo - Faculté des Sciences, BP 906, Antananarivo 101, Madagascar.

<sup>5</sup> FOFIFA/CIRAD Antsirabe, BP 230, Antsirabe 110, Madagascar.

**Résumé**

Le riz tient une place importante dans l'alimentation à Madagascar. Afin d'assurer la sécurité alimentaire, une augmentation de la production en riz est incontournable. Celle-ci peut se faire en développant la riziculture pluviale vu la possibilité limitée d'aménager de nouvelles surfaces pour la riziculture irriguée. La région du Moyen Ouest possède de vastes superficies propices à la riziculture pluviale. Cette dernière est surtout pratiquée par une agriculture familiale de subsistance qui utilise peu d'intrants sur des sols souvent peu fertiles. Face à cette situation, le programme de sélection variétale du FOFIFA/CIRAD s'est intéressé à améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'azote par la plante afin de développer des variétés de riz pluvial avec une meilleure capacité à prélever l'azote du sol et à l'utiliser pour produire du grain. Pour ce faire, deux approches complémentaires ont été développées: (i) Une évaluation de la variabilité génétique du NUE à deux niveaux d'azote contrastés en utilisant un panel réduit de 13 variétés de riz pluvial pendant 3 campagnes afin d'analyser les relations entre NUE, ses composantes (efficacité de l'absorption et efficacité de la conversion de l'azote) et les composantes du rendement; (ii) Une étude d'association utilisant un panel de 198 variétés de riz pluvial, phénotypés pour le NUE pendant 2 campagnes et génotypés par séquençage, afin de tenter d'identifier les zones du génome responsables de la variation de l'efficacité de l'utilisation de l'azote. Les résultats ont montré une forte corrélation entre NUE et le rendement; et parmi les composantes de rendement, le nombre de panicule/m<sup>2</sup> et l'indice de récolte sont corrélés positivement avec le NUE. Un faible nombre d'associations ont été détectées pour le NUE et ses composantes correspondant à 3 QTLs pour le NUE, 2 QTLs pour le NUPE et 12 QTLs pour le NUTE.

**Mots clés :** riziculture, variétés, moyen ouest, SNP, QTL, efficacité d'absorption de l'azote, efficacité de conversion de l'azote.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Matériel végétal et dispositif expérimental

Les variétés utilisées dans cette étude sont des variétés de riz pluvial du groupe *Japonica* tropical. Les expérimentations ont été menées à Ivory (à 945 m d'altitude) dans le Moyen Ouest de Madagascar. Deux expérimentations ont été effectuées : (i) une expérimentation préliminaire avec 13 variétés pendant 3 campagnes (2012-2013, 2013-2014, 2014-2015) sur un dispositif en blocs randomisés avec 6 répétitions et (ii) une expérimentation avec un panel de 198 variétés dans un dispositif alpha plan avec 2 répétitions pendant 2 campagnes (2014-2015, 2015-2016).

### 1.2. Traitements

Les variétés ont été testées sous 2 niveaux de traitements azotés : un niveau sans azote (N-) et un niveau avec azote (N+) où l'on a apporté 90 kgN/ha en 2012-2013, 2013-2014 et 120 kgN/ha en 2014-2015 et 2015-2016. Au moment du semis, une fertilisation de base a été appliquée sur toutes les parcelles, ceci consiste à apporter 5000kg/ha de fumier, 500kg/ha de dolomie, 150kg/ha de triple superphosphate et 130kg/ha de sulfate de potassium.

### 1.3. Phénotypage

Les variétés ont été phénotypées pour le rendement et ses composantes (nombre de panicules/m<sup>2</sup> et d'épillets/panicule, poids du grain et pourcentage de grain plein), l'indice de récolte, la teneur en azote dans la plante, l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) et ses composantes (NUpE et NUtE). La teneur en azote dans la plante a été mesurée à l'aide d'un Spectroscopie Proche Infrarouge (SPIR).

### 1.4. Génotypage des accessions

Les variétés ont été génotypées par séquençage (Genotyping by sequencing\_GBS). 38390 marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism) ont été retenus après sélection des marqueurs présentant une fréquence de l'allèle mineur supérieure à 4%.

### 1.5. Analyse des données

L'étude d'association a été effectuée à l'aide du logiciel TASSEL 5 (Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage) en associant des données phénotypiques (NUE, rendement, etc..) avec les données génotypiques (marqueurs) en utilisant l'approche simple marqueur.

## 2. Résultats

### 2.1. Variation du NUE et sa relation avec les autres traits

La moyenne de NUE varie de 34,18 kg/kgN à 38.75 kg/kgN en condition sans azote (N-) et de 19,51 kg/kgN à 27,93 kg/kgN en condition avec azote (N+). Une variation phénotypique significative a été observée entre les variétés pour le NUE ainsi que pour ses composantes. Une



corrélation positive significative a été observée entre le NUE et le NUPE quelle que soit l'année et le niveau d'azote (entre  $r=0.56$  au minimum et  $r=0.92$  au maximum) (Annexe, Figure 1). Entre NUE et NUTE la corrélation a été significative seulement en 2012-2013\_N+, 2013-2014\_N+ et 2014-2015\_N- (Annexe, Figure 1). La variation du NUPE contribue plus que la variation du NUTE à la variation du NUE. La corrélation entre NUPE et NUTE n'est jamais significative ( $r=0.03$  au minimum et  $r=0.25$  au maximum). Une corrélation positive significative a été montrée entre le NUE et le nombre de panicule/m<sup>2</sup> lors de 2 campagnes sur 3 quel que soit le niveau d'azote (en condition sans azote,  $r=0.73$  en 2012-2013 et  $r=0.78$  en 2013-2014 ; en conditions avec azote,  $r=0.61$  en 2012-2013 et  $r=0.64$  en 2013-2014) (Annexe, Figure 1), ces corrélation sont plus fortes en condition sans azote. Une corrélation positive significative a aussi été montrée entre le NUE et l'indice de récolte dans 2 campagnes quel que soit le niveau d'azote (en condition sans azote,  $r=0.87$  en 2013-2014 et  $r=0.72$  en 2014-2015 ; en condition avec azote,  $r=0.58$  en 2013-2014 et  $r=0.82$  en 2014-2015) (Annexe, Figure 1), ce qui montre que l'amélioration de ces deux caractères améliorent significativement le NUE.

## 2.2. Associations entre marqueurs et NUE

Un total de 38390 SNP a été utilisé pour l'analyse d'association. Compte tenu de la structure du déséquilibre de liaison ( $r^2=0.25$  entre SNP distants de 600kb), nous avons considéré que des associations avec un même caractère détectées à deux SNP distant de moins de 600 kb appartiennent à un même QTL. Nous avons fixé le seuil de significativité d'une association à  $p < 0.0001$ . Les résultats de l'analyse d'association ont mis en évidence 36 SNP significativement associés au NUE et à ses composantes (Annexe, Tableau 1). Ceux-ci sont répartis en 16 QTLs et détectés sur le chromosome 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11. 3 QTL ont été détectés pour le NUE, 2 QTL pour le NUPE et 13 QTL pour le NUTE. Un SNP (S11\_19200467) sur la région chromosomique q14 du chromosome 11 explique 10% de la variation phénotypique totale de NUE (qNUE). Ce SNP associé à NUE est en colocalisation avec le NUTE (Annexe, Tableau 2).

## 3. Discussions

En condition de faible azote, certaines variétés ont été capables de produire en moyenne jusqu'à 38,75 kg de grain/kg N dans le sol ce qui est très intéressant pour les sélectionneurs. Les composantes NUPE et le NUTE sont corrélés au NUE. En revanche, le NUPE et le NUTE ne sont pas corrélés. Cela suggère qu'il est possible d'améliorer chacune des composantes du NUE indépendamment comme cela a déjà été observé par Barraclough et al. (2010). Les résultats ont montré aussi une corrélation positive entre NUE et le nombre de panicules/m<sup>2</sup> (Rakotoson et al, 2017), ce qui montre que le tallage (évalué à travers le nombre de panicules/m<sup>2</sup>) est un facteur très important qui peut déterminer jusqu'à 61% de la variation de NUE sur le riz pluvial. L'identification de ces caractères (le nombre de panicule/m<sup>2</sup>, l'indice de récolte) indique que

l'amélioration du NUE est étroitement liée à l'amélioration du rendement en grain et ses composantes.

L'analyse d'association a été utilisée afin d'identifier les régions chromosomiques associées au NUE. Elle a révélé très peu d'associations pour NUE (3 QTL seulement). La décomposition de NUE en 2 composantes (NUpE et NUtE) devrait faciliter l'étude génétique de NUE mais très peu d'associations aussi ont été révélées sur ces composantes (2 QTL seulement pour NUpE et 13 QTL pour NUtE), ce qui montre que ces caractères sont très complexes et que les nombreux gènes qui les contrôlent ont des faibles effets, ce qui les rend difficilement détectables dans l'étude d'association au seuil que nous avons fixé. Nous avons identifié un seul gène candidat lors de notre analyse pour l'efficacité de l'utilisation de l'azote. Nous avons trouvé une colocalisation pour NUE, NUtE et le rendement en grain au niveau de S11\_19200467, ce qui implique que ce SNP est impliqué dans la variation du rendement en grain et NUE. Les QTLs identifiés dans cette étude pourront être utilisés par les sélectionneurs afin de développer des variétés efficaces pour l'utilisation de l'azote mais il reste beaucoup de chemin à parcourir pour bien comprendre le déterminisme génétique du NUE.

### **Conclusion**

Cette étude nous a permis de montrer l'existence d'une variabilité génétique significative pour le NUE et ses composantes dans les ressources génétiques utilisées en amélioration génétique du riz pluvial à Madagascar. Une relation forte a été trouvée entre le NUE et le nombre de panicules/m<sup>2</sup> et l'indice de récolte, quel que soit l'année et le niveau d'azote. Un nombre limité de régions chromosomiques liées au NUE et ses composantes ont été identifiées. D'autres études devront être conduites pour avoir une compréhension plus complète du déterminisme génétique du NUE. Les données produites dans le cadre de cette étude pourront aussi être exploitées pour alimenter des modèles de sélection génomique. Cette dernière approche est certainement la mieux adaptée pour manipuler des caractères quantitatifs complexes. .

### **Référence bibliographique**

- Barracough, P.B., Howarth, J.R., Jones, J., Lopez-Bellido, R., Parmar, S., Shepherd, C.E., Hawkesford, M.J., 2010. Nitrogen efficiency of wheat: genotypic and environmental variation and prospects for improvement. *Eur. J. Agron.* 33, 1–11.
- Fageria, N.K., Morais, O.P., Santos, A.B., 2010. Nitrogen use efficiency in upland rice genotypes. *J. Plant Nutr.* 33, 1696–1711.
- Haefele, S.M., Jabbar, S.M.A., Siopongco, J.D.L.C., Tirol-Padre, A., Amarante, S.T., Sta Cruz, P.C., Cosico, W.C., 2008. Nitrogen use efficiency in selected rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under different water regimes and nitrogen levels. *Field Crop. Res.* 107, 137–146.

- Koutroubas, S., Ntanos, D., 2003. Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in Indica and Japonica rice under Mediterranean conditions. *Field Crop. Res.* 83, 251–260.
- Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., 1982. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agron. J.* 74, 562–564.
- Raboin, L.M., Randriambololona, T., Radanielina, T., Ramanantsoanirina, A., Ahmadi, N., Dusserre, J., 2014. Upland rice varieties for smallholder farming in the cold conditions in Madagascar's tropical highlands. *Field Crop. Res.* 169, 11–20.
- Rakotoson T., Dusserre J., Letourmy P., Ramonta R.I., Cao T.V., Ramanantsoanirina A., Roumet P., Ahmadi N., Raboin L.M. 2017. Genetic variability of nitrogen use efficiency in rainfed upland rice. *Field Crop. Res.* 213, 194-203.
- Senthilvel S., Vinod K.K., Malarvizhi P., Maherswaran M. 2008. QTL and QTL × Environment Effects on Agronomic and Nitrogen Acquisition Traits in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology.* 50 (9), 1108–1117.
- Wei D., Cui K., Pan J., Ye G., Xiang J., Nie L., Huang J. 2011. Genetic dissection of grain nitrogen use efficiency and grain yield and their relationship in rice. *Field Crop. Res.* 124, 340-346.
- Yu J., Buckler E.S. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology.* 17(2), 155–160.

#### Annexe :

Tableau 1: Résultat de l'analyse d'association par simple marqueur pour NUE, NUpE et NUtE. Associations significatives représentées par les valeurs de p-value pour chaque trait, R<sup>2</sup> des marqueurs, effets des marqueurs, fréquence des allèles mineurs (Minor allele frequency MAF), nombre d'allèle majeur et mineur pour chaque marqueur.

QTL	Chrom	position	NUE	NUpE	NUtE	Marker R <sup>2</sup>	Marker effect	MAF	Nb allèle majeur	Nb allèle mineur
q1	1	1 562 879			9.09E-05	0.08	-3.83	0.33	128	62
q2	1	3 031 975			2.85E-05	0.10	-5.33	0.06	178	12
	1	3 034 970			4.78E-05	0.09	7.09	0.05	181	9
q3	1	4 825 760			1.89E-05	0.10	-7.87	0.05	181	9
	1	5 092 077			4.53E-05	0.09	-7.26	0.04	182	8
q4	1	29 135 405			7.26E-05	0.08	-7.77	0.06	179	11
q5	3	1 395 165			7.84E-05	0.09	-3.06	0.16	160	30
q6	4	19 850 161			6.87E-06	0.11	-7.66	0.04	182	8
q7	5	2 395 571		8.93E-05		0.08	0.04	0.33	128	62
q8	6	21 460 579			9.05E-05	0.08	-7.36	0.06	179	11
	6	21 981 538		5.91E-05		0.09	-0.04	0.17	158	32
	6	21 981 539		5.91E-05		0.09	-0.04	0.17	158	32
	6	21 981 555		5.91E-05		0.09	0.04	0.17	158	32
	6	22 089 331		3.95E-05		0.09	0.04	0.15	162	28
q9	6	23 769 532	4.21E-05			0.09	-3.86	0.15	162	28
	6	23 769 544	3.86E-05			0.10	-3.81	0.16	160	30

q10	7	22 426 843	3.56E-05			0.10	3.70	0.13	165	25
q11	9	1 824 735			7.88E-05	0.08	-3.72	0.11	169	21
q12	9	19 018 354			1.47E-05	0.10	-8.12	0.05	180	10
q13	10	10 224 043			1.64E-05	0.10	6.35	0.08	175	15
	10	10 229 062			1.64E-05	0.10	-6.35	0.08	175	15
	10	10 229 142			2.17E-05	0.10	-6.36	0.07	176	14
	10	10 231 077			1.29E-05	0.10	-6.74	0.07	176	14
	10	10 271 091			1.29E-05	0.10	6.73	0.07	176	14
	10	10 271 097			1.29E-05	0.10	6.73	0.07	176	14
	10	10 278 092			1.64E-05	0.10	6.35	0.08	175	15
	10	10 278 094			1.64E-05	0.10	-6.35	0.08	175	15
	10	10 278 095			1.64E-05	0.10	-6.35	0.08	175	15
	10	10 278 099			1.64E-05	0.10	-6.35	0.08	175	15
q14	10	10 302 827			2.17E-05	0.10	-6.36	0.07	176	14
	11	19 200 467	8.67E-06			0.10	5.48	0.05	180	10
	11	19 200 467			2.81E-05	0.09	8.19	0.05	180	10
	11	19 365 597			4.28E-05	0.09	6.59	0.05	181	9
	11	19 582 033			8.09E-05	0.08	4.37	0.21	150	40
q15	11	20 004 072			4.30E-05	0.09	7.29	0.05	181	9
	11	21 164 565			7.16E-05	0.09	6.39	0.05	180	10
q16	11	22 302 701			8.63E-05	0.08	5.22	0.14	163	27

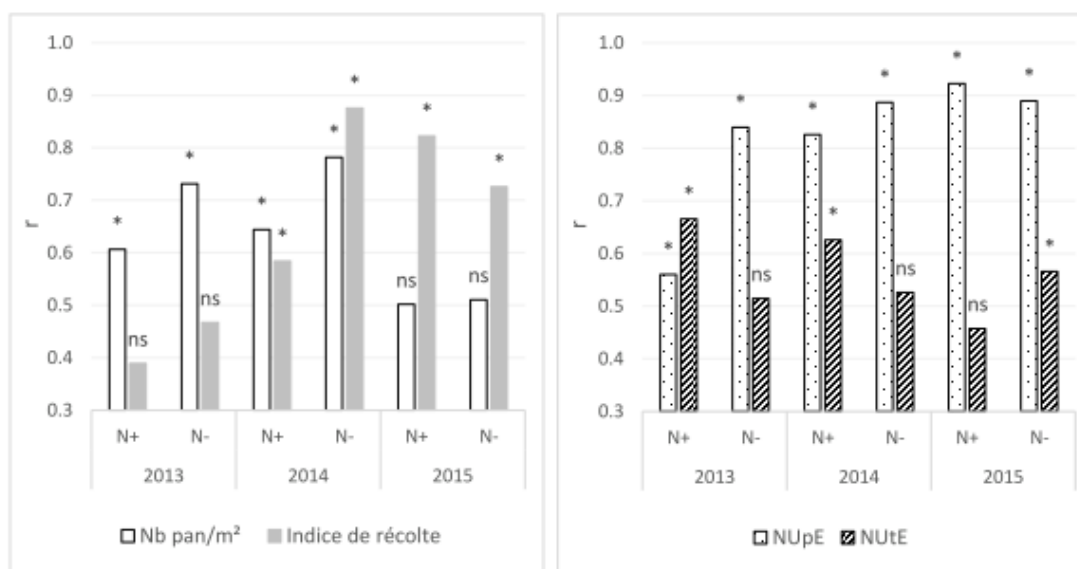


Figure 1: Corrélation entre NUE et nombre de panicule/m<sup>2</sup> et Indice de récolte (gauche); entre NUE et NUpE et NUtE (droite). \* représente une corrélation significative à p<0.05, ns : non significative.

Genetic basis of nitrogen use efficiency in rainfed upland rice (*Oryza sativa* L.) in Madagascar

**Abstract**

Rainfed upland rice plays an important role on Malagasy farms, especially on the "tanety" of the Highlands and the Middle West. However, soils of "tanety" are often very little fertile, including nitrogen, which is a limiting factor in the yield of cereals such as rice. In addition, rice farmers cannot afford chemical fertilizers and yields are very low. The challenge of improving the nitrogen use efficiency (NUE) trait is therefore crucial in this context of low use of chemical fertilizers. The creation of varieties for these low-input systems should be considered. The overall objective of this study is therefore to contribute to a better understanding of the genetic determinism of the NUE in the rainfed upland rice and the elaboration of grain yield according to the nitrogen nutrition. Two experiments were then conducted at Ivory, in the Middle West of Madagascar, during four growing season (2012 to 2016) to evaluate the level of genetic variability existing for NUE and other related agronomic traits, and to identify chromosomal regions responsible for the variation of these traits on rainfed upland rice, using genome wide association study (GWAS).

The first experiment was conducted on 13 varieties of rainfed upland rice in a randomized block device with six replicates and two levels of nitrogen fertilization (low and high) for three seasons (2012-2015). A total of 21 traits were measured, including NUE and its components as well as grain yield (GY) and its components. There was a genetic variability for NUE and its two components, as well as for all other traits measured in rainfed upland rice. Variation in Nitrogen Uptake Efficiency (NUPE) contributes most strongly to the variation of NUE, whatever the level of nitrogen supply. We did not observe the frequently negative relationship between NUE and grain nitrogen content (GNC) under low nitrogen conditions. The value of the post-flowering nitrogen uptake (POSTFLNUP), which were measured by the difference between nitrogen uptake at flowering and at maturation was negative, it suggest that nitrogen losses, through volatilization, occurred after flowering. It should be noted that POSTFLNUP is always higher at low nitrogen than at high nitrogen level and there was a positive and significant correlation between NUE and POSTFLNUP at low nitrogen level.

The second experiment was carried out in a panel of 198 varieties of rainfed upland rice in an alpha plan device with two replications and two nitrogen level over two growing seasons (2014 to 2016). Phenotypic field data for 21 agronomic traits, including NUE and its components, and genotypic data from 190/198 varieties with 38390 SNP markers, were yielded to implement the genome wide association study. A total of 306 marker-trait associations were identified at the threshold of  $p = 10^{-4}$ . The markers involved in these associations and which are in strong linkage disequilibrium were grouped into 47 haplotype. Very few significant associations were detected for complex traits like NUE or GY but much more for all of their components, which confirms the interest of splitting these complex trait into simpler and more heritable traits. However, three haplotypes are particularly interesting because they have pleiotropic effects on a large number of traits. Two out of three are associated with NUE and GY. A certain number of candidate genes, close to identified association signals, have been proposed as being able to be involved in the variation of the studied trait. However these indications remain very speculative given the level of resolution of GWAS in our study.

**Key words:** upland rice, variety, nitrogen use efficiency, genome wide association mapping

**Author** : Luciano Tatiana RAKOTOSON [tatianarakotoson@gmail.com](mailto:tatianarakotoson@gmail.com)  
**Thesis supervisor** : Isabelle RATSIMALA RAMONTA [ramonta@moov.mg](mailto:ramonta@moov.mg)  
**Thesis co-supervisor** : Louis-Marie RABOIN [louis-marie.raboin@cirad.fr](mailto:louis-marie.raboin@cirad.fr)

Etude des bases génétiques de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du riz pluvial  
(*Oryza sativa* L.) à Madagascar

**Résumé**

La riziculture pluviale prend une place importante dans les exploitations agricoles Malagasy, en particulier sur les « tanety » des Hautes terres et du Moyen Ouest. Pourtant, les sols de « tanety » sont souvent très peu fertiles, notamment, en azote, qui est un facteur limitant du rendement des céréales comme le riz. De plus, les riziculteurs n'ont pas les moyens d'apporter des engrais chimiques et les rendements restent très faibles. L'enjeu de l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) est donc crucial dans ce contexte d'agriculture de subsistance ayant très peu recours aux engrais chimiques. La création de variétés pour ces systèmes à bas niveau d'intrants doit être envisagée. L'objectif global de cette étude est donc de contribuer à une meilleure compréhension du déterminisme génétique du NUE du riz pluvial et de l'élaboration du rendement en grains en fonction de la nutrition azotée. Pour ce faire, deux expérimentations ont été menées à Ivory, dans le Moyen Ouest de Madagascar, pendant quatre campagnes successives (2012 à 2016) pour évaluer le niveau de variabilité génétique existant pour NUE et d'autres caractères agronomiques, et pour identifier les régions chromosomiques responsables de la variation de ces caractères sur le riz pluvial, à l'aide de la génétique d'association (GWAS).

La première expérimentation a été menée sur 13 variétés de riz pluvial dans un dispositif en bloc randomisé avec six répétitions et deux niveaux de fertilisation azotée (faible et fort), pendant trois campagnes (2012 à 2015). Au total, 21 caractères ont été mesurés dont le NUE et ses composantes ainsi que le rendement en grains (GY) et ses composantes. Une variabilité génétique pour NUE et ses deux composantes, ainsi que pour tous les autres caractères mesurés, a été montrée sur le riz pluvial. La variation de l'efficacité de l'absorption de l'azote (NUPE) contribue le plus, fortement, à la variation de NUE, quel que soit le niveau d'azote du milieu. Nous n'avons pas observé la relation négative fréquemment reportée entre NUE et la teneur en azote des grains (GNC) dans les conditions de faible niveau d'azote. Les mesures négatives d'absorption d'azote post-floraison (POSTFLNUP), qui ont été mesurées par la différence entre absorption d'azote à floraison et à maturité, tendraient à indiquer que des pertes d'azote, par volatilisation, seraient intervenues après la floraison. Il est à noter que POSTFLNUP est toujours plus élevé à faible niveau d'azote qu'à fort niveau d'azote et qu'il existe une corrélation positive et significative entre NUE et POSTFLNUP à faible niveau d'azote.

La deuxième expérimentation a été effectuée sur un panel de 198 variétés de riz pluvial dans un dispositif alpha plan avec deux répétitions sur deux campagnes (2014 à 2016) et deux niveaux d'azote. Des données phénotypiques sur le terrain concernant 21 caractères agronomiques, dont le NUE et ses composantes, et des données de génotypage par séquençage pour 190/198 variétés, donnant 38390 marqueurs SNP, ont été acquises pour mettre en œuvre une étude de génétique d'association. Au total, 306 associations marqueurs-caractères ont été identifiées au seuil de  $p=10^{-4}$ . Les marqueurs impliqués dans ces associations et qui sont en fort déséquilibre de liaison ont été regroupés en 47 régions haplotypiques. Très peu d'associations significatives ont été détectées pour les caractères complexes comme NUE ou GY mais beaucoup plus pour l'ensemble de leurs composantes, ce qui confirme l'intérêt de décomposer ces caractères complexes en des caractères plus simples et plus héréditaires. Toutefois, trois haplotypes sont particulièrement intéressants car ils ont des effets pléiotropiques sur un grand nombre de caractères. Deux sur trois sont associés au NUE et au GY. Un certain nombre de gènes candidats, proche de signaux d'association détectés, ont été proposés comme pouvant être impliqué dans la variation des caractères étudiés. Toutefois ces indications restent très spéculatives compte tenu du niveau de résolution de GWAS dans notre étude.

**Mots clés** : riz pluvial, variétés, efficacité de l'utilisation de l'azote, génétique d'association

**Auteur** : Luciano Tatiana RAKOTOSON

[tatianarakotoson@gmail.com](mailto:tatianarakotoson@gmail.com)

**Directeur de thèse** : Isabelle RATSIMALA RAMONTA

[ramonta@moov.mg](mailto:ramonta@moov.mg)

**Co-directeur de thèse** : Louis-Marie RABOIN

[louis-marie.raboin@cirad.fr](mailto:louis-marie.raboin@cirad.fr)