

VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA TENEUR EN GLUCOSINOLATES ET DES CARACTÈRES AGRONOMIQUES CHEZ LA MOUTARDE BRUNE (*BRASSICA JUNCEA* L.)

Othmane Merah^{1,2,3}, Ahmed
Adda⁴, Zahreddine

Djazouli⁵, Bachar Zebib⁶

¹ENESAD, Département
Agronomie -

Environnement, 21, Bd
Olivier de Serres, F-21800,
Quetigny, France.

²Université de Toulouse,
INP-ENSIACET, LCA
(Laboratoire de Chimie
Agro-industrielle), F-31030
Toulouse, France

³INRA, UMR 1010 CAI,
F-31030 Toulouse, France

⁴Laboratoire d'agro-
biotechnologie et de
nutrition en zones semi-
aride Université Ibn
Khalidoun de Tiaret, Algérie

⁵Université Blida 1, Faculté
des Sciences de la Nature et
de la Vie, département de
Biotechnologies, BP 270,
route de Soumâa, Blida
(Algérie)

⁶Agromutition SAS, Parc
Activestre 31390 Carbonne,
France

Résumé

Brassica juncea, appelée communément moutarde brune, est principalement utilisée pour la production de pétrole qui implique la sélection de génotypes avec le niveau de glucosinolates faible et forte teneur en huile. En revanche, la production de condiments doit varier à haut niveau dans certains glucosinolates entre eux sinigrine. La variabilité génétique a été principalement abordée à diminuer le niveau de glucosinolates ou par des outils moléculaires sans aucune relation avec des caractères d'intérêt. De plus, la richesse des Brassicaceae en glucosinolates, responsables des activités allélopathiques, pourrait élargir les perspectives d'utilisation de ces espèces pour la biofumigation. Par conséquent, l'objectif de ce travail est d'étudier la variabilité génétique de la teneur en différents glucosinolates et leurs relations avec les traits agronomiques dans une grande collection de génotypes de moutarde. L'utilisation émergente des Brassicaceae pour biofumigation.

Une collection de 190 génotypes d'origines géographiques différentes a été étudiée à l'ENESA de Dijon (France). La teneur en glucosinolates totaux, en sinigrine et en gluconapine a été évaluée. La floraison et la durée de maturation ont été notées. Le rendement en grain et ses composantes ont également été mesurés.

Une large variabilité génotypique a été observée pour les caractères mesurés au sein de la collection étudiée. Les glucosinolates totaux varient deux fois entre les génotypes extrêmes. Les valeurs de teneur sinigrine varient de 0 à plus de 134 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. Les corrélations entre les glucosinolates et les caractères phénologiques et agronomiques sont présentées et discutées pour le potentiel de biofumigation.

INTRODUCTION

La moutarde brune (*Brassica juncea* L.) est l'une des trois espèces oléagineuses de la famille des Brassicaceae. Comme c'est le cas en Inde et en Chine, la moutarde brune est utilisée pour la production d'huile qui a impliqué la sélection de variétés à faible teneur en glucosinolates et de faibles niveaux d'acide érucique dans les grains. Au contraire, en Bourgogne, où la moutarde est utilisée pour la production de condiment "Moutarde de Dijon", les graines doivent être riches en sinigrine (2-propenyl GSL) et pauvre en gluconapine (3-butenyl GSL). Après

l'écrasement des graines, la sinigrine subit une hydrolyse par une myrosinase (une glucosylsulfatase) et aboutit à la libération de l'allyl-isothiocyanate, qui est un composé volatil responsable de la saveur de la moutarde condimentaire. La sinigrine ainsi que d'autres glucosinolates sont également responsables des activités allélopathiques des espèces de la famille Brassicaceae. Ces activités ont été étudiées dans le genre Brassica qui contient d'importantes quantités de thioglucoside composés appelés glucosinolates (GLS) dans leurs tissus (Inderjit et al., 1999 ; Fahey et al., 2001).

La plupart de ces travaux ont souligné l'intérêt de la moutarde brune (*Brassica juncea*) pour la biofumigation soit comme engrais vert ou de la farine de graines délipidée pour éliminer les parasites et les maladies du sol (Brown et al., 1997 ; Inderjit et al., 1999 ; Boydston et al., 2004 ; Marchetti et al., 2004 ; Quinsac et al., 2004 ; Van Os et al., 2004 ; Nancé et al., 2012). Les généticiens cherchent une grande variabilité pour initier des programmes de sélection. Par conséquent, l'étude de la diversité génétique des glucosinolates sur une grande collection de moutarde brune aiderait les sélectionneurs pour le dépistage des géniteurs afin de créer de nouvelles variétés de moutarde à haute teneur en sinigrine. Cependant, la majorité des travaux réalisés a été menée pour diminuer la teneur en glucosinolates (Chauhan et al., 2003 , Sodhi et al., 2003), l'acide érucique, ou d'augmenter la teneur en huile des graines (Agnihotri et al., 2003) . D'autres études ont utilisé des marqueurs moléculaires pour structurer la diversité génétique (Jain et al., 1994, Ogbonnaya et al., 2003 , Wu et al., 2003). Néanmoins, ces études n'ont pas grandement aidé les sélectionneurs pour le choix des parents des croisements pour améliorer les teneurs en glucosinolates. Les quelques études qui ont porté sur l'évaluation des glucosinolates ont été effectuées sur quelques génotypes ou réalisées sur les tissus verts ou les deux (Kirkegaard et al., 1999, Merah et al., 2004) Par conséquent, les objectifs de cette étude sont l'évaluation de la variabilité génétique de la teneur en glucosinolates dans les graines et pour l'examen des relations entre

eux et traits agronomiques.

Matériels et méthodes

Le matériel végétal et la gestion des cultures

Une collection de 190 génotypes de différentes origines géographiques a été utilisée dans cette étude. Les génotypes ont été cultivés dans des conditions pluviales, dans le domaine expérimental de l'ENESA (Etablissement National d'Enseignement Supérieur Agronomique) de Dijon (Nord- Est de la France) le 26 mars 1997. Le dispositif expérimental choisi est un dispositif en blocs aléatoires complets, avec deux répétitions par génotype. Les graines ont été semées dans deux rangées de 5m par parcelle (70 cm de lignes d'espacement et un inter- rangs de 5cm). L'espacement entre les génotypes était 90cm.

Conditions climatiques

Les précipitations cumulées au cours de la saison de culture (de Mars à Août) ont dépassées les 345mm, ce excède la quantité de pluie habituellement enregistrée pour cette région. Toutefois, les précipitations ont été inégalement réparties. En effet, près de 72% des précipitations sont tombées au cours des trois derniers mois de la période de végétation. Cette augmentation des précipitations a été accompagnée d'une augmentation de la température qui à son tour augmente la demande évaporative, à la fin du cycle de la plante.

Caractères étudiés

Afin de déterminer la durée de la floraison et de la maturation, les dates de début et de fin de la floraison ainsi que la maturation ont été notées. La date de début (DBF) et fin (DEF) de la floraison ont été notées lorsque 10% et 90 % des plantes dans chaque parcelle avaient fleuris. La date de maturation (DM)

a été notée lorsque les grains ont atteint un taux d'humidité de 9%. La durée de la floraison et la maturation ont été calculées comme suit :

Durée de la floraison = DEF – DBF

Durée de maturation = DM – DEF

A la fin de la floraison, la hauteur des plantes (PH, en cm) a été mesurée et le nombre de plantes par rangée (NP/R) et le nombre de siliques par rangée (NSR) ont été dénombrés.

À maturité, le nombre de grains par silique (NGS) a été déterminé sur un échantillon aléatoire de 100 siliques pour chaque génotype dans chaque parcelle. Les grains sont ensuite pesés et le poids des grains par silique (GWS) calculées. Les plantes ont été récoltées par parcelle et les grains pesés pour déterminer le rendement en grains par parcelle. Le rendement en grains par plante (GYP) a été calculé en divisant par le nombre de plantes par parcelle. Le poids de mille grains a également été déterminé.

Les teneurs en sinigrine (SIN), en gluconapine (GNP) et en glucosinolates totaux (GSL) dans le grain ont été directement déterminées par HPLC (BBBB) sur des échantillons de 50g de graines. La teneur en glucosinolates a été exprimée en $\mu\text{mol/g}$ de graines.

La teneur en huile a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN xxxxx) et exprimée en % de la matière sèche.

Analyses statistiques

Toutes les données ont été soumises à une analyse de variance en utilisant la procédure GLM de SAS. Les corrélations entre les caractères mesurés ont été examinées avec la procédure CORR de SAS.

Résultats

L'analyse de la variance a montré une grande variabilité génotypique pour les caractères mesurés (Tableau 1). La valeur moyenne de la teneur totale en glucosinolates au sein de la collection a été étudié plus

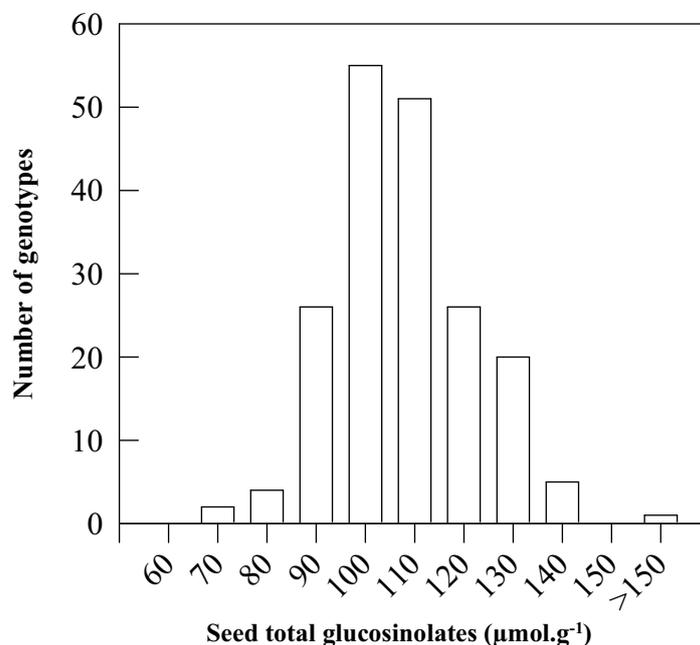
de 103 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. La différence entre les génotypes extrêmes pour ce caractère était deux fois (Fig. 1). Le composant le plus important de ces glucosinolates est la sinigrine (SIN) qui varie de 0 à 134,2 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. La teneur en gluconapine (GNP) a

présenté une moins grande plage de variation que pour SIN (Fig. 1). La valeur moyenne des SIN était près de trois fois plus élevés que ceux du GNP.

Tableau 1. Moyenne, écartype, et valeurs minimum les maximales de la composition des graines en glucosinolates ainsi que des traits agronomiques mesurés sur une collection de 190 génotypes. Effet génotypique pour chaque caractère est également donné.

Trait	Moyenne	Ecartype	Minimum	Maximum	Effet Genotype
Durée de Floraison (days)	25.0	2.2	21.0	33.0	***
Durée de remplissage du grain (days)	46.7	5.0	35.0	63.0	***
Hauteur de la plante (cm)	176.5	26.0	105.0	230.0	***
Number of seeds / tige	14.4	2.7	3.1	20.4	**
Poids des grains / tige (g)	45.8	14.0	14.2	99.8	**
Poids de mille grains (g)	3.2	0.9	1.6	7.3	***
Rendement en grain / plant (g)	10.5	2.6	3.1	17.8	***
Teneur en glucosinolates ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	103.3	14.2	68.0	153.0	***
Teneur en sinigrine ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	73.0	35.4	0.0	134.2	***
Teneur en gluconapine ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	27.0	37.4	0.0	106.3	***

** and ***, significatif à la probabilité de 0.01 et 0.001, respectivement..



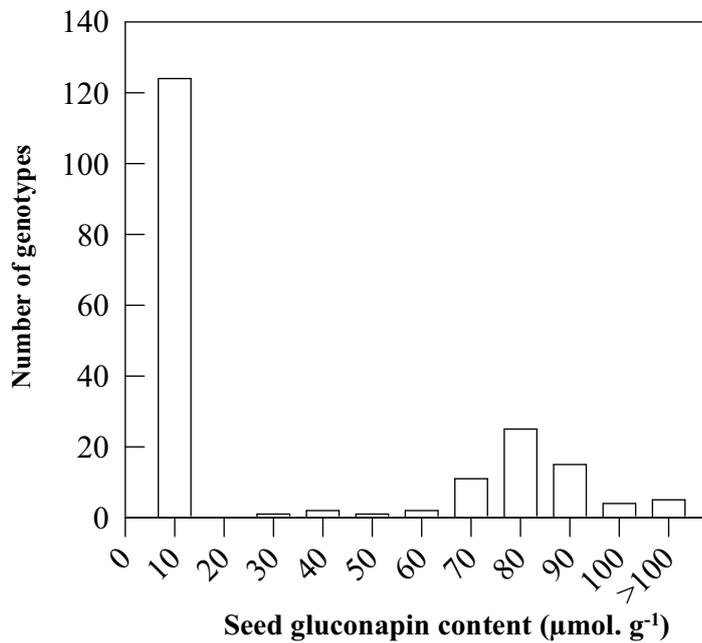
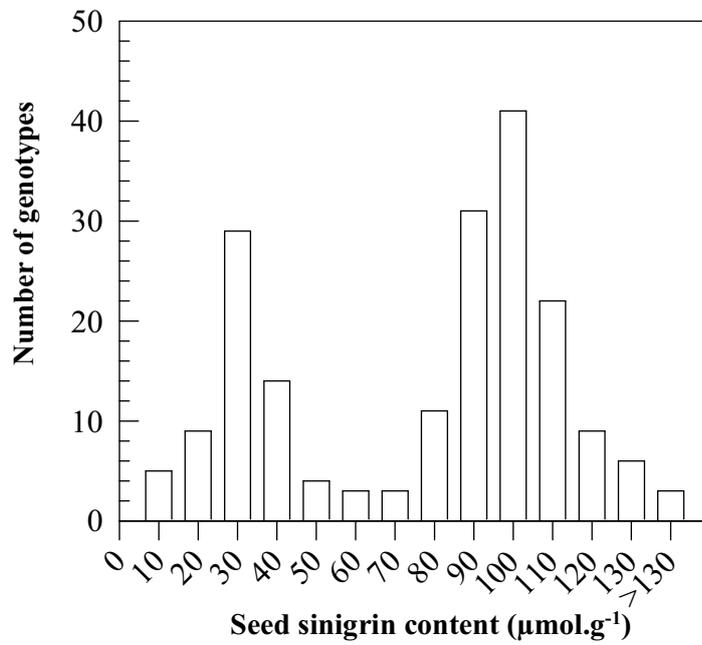


Figure 1. Répartition des valeurs des teneurs en glucosinolates totaux, de sinigrine et de gluconapine dans les graines de moutarde brune évaluées sur une collection de 190 géotypes.

De grandes différences génotypiques ont également été observées pour la durée de la floraison (DF) et de maturation (DM) au sein de la collection. Une différence de douze jours a été notée entre les génotypes extrêmes pour la durée de la floraison. Ces différences étaient plus marquées pour la durée de remplissage du grain puisque certains génotypes ont mis deux fois plus de temps pour arriver à maturation que d'autres. La même tendance a été signalée pour la hauteur des plantes. En fait,

certains génotypes ont une hauteur de plante deux fois plus élevée que les génotypes les plus courts. Les différences les plus contrastées ont été observées pour le poids de mille grains (PMG), le nombre de grains par silique (NG/S) et le rendement en grains par plante (GY/P) pour lesquels on a observé une augmentation de près de 450%, 500% et 600% entre les accessions extrêmes, respectivement.

L'analyse de corrélation (Tableau 2) a montré que les glucosinolates totaux et le GNP ont été

positivement corrélés à la durée de remplissage du grain et au PMG. En outre, GNP est corrélé positivement à GY/P et négativement à hauteur de la plante et le SIN. Ce dernier caractère est significativement associé au PMG, à la hauteur de la plante, au GY/P et à DM. La corrélation positive la plus importante observée entre les traits agronomiques a été entre le rendement en grain et PMG. Ces deux traits sont liés positivement à DM.

Trait	Glucosinolates totaux	Teneur en sinigrine	Teneur en gluconapin
Durée de floraison	0.07	0.01	0.02
Durée de remplissage du grain	0.32***	-0.55***	0.65***
Hauteur de la plante	-0.04	0.73***	-0.71***
Number of seeds / tige	-0.26**	-0.15	0.04
Poids des grains / tige	0.04	-0.52***	0.50***
Poids de mille grains	-0.21*	-0.47***	0.52**
Rendement en grain / plant	-0.18*	-0.45***	0.35***
Teneur en glucosinolates	---	0.07	0.32***
Teneur en sinigrine	---	---	-0.92***

*, **, *** significatif à la probabilité de 0.05, 0.01 et 0.001, respectivement.

Discussion

Une large variabilité génotypique a été observée au sein de la collection étudiée pour tous les caractères mesurés (Tableau 1). Les valeurs notées pour la teneur en glucosinolates totaux étaient similaires à celles rapportées par Lionneton et al. (2004) au sein d'une population d'haploïdes doublés pour la cartographie génétique. La gamme des teneurs en glucosinolates obtenues dans notre étude est cependant largement supérieure à celles déjà rapportées dans d'autres études sur le contenu en GLS dans les graines de moutarde. En fait, la plupart de ces études se sont concentrées sur les

variétés utilisées pour la production d'huile alimentaire, et donc avec de faibles teneurs en glucosinolates et en acide érucique (Chauhan et al., 2003 ; Sodhi et al., 2003 ; Agnihotri et al., 2003). L'analyse détaillée de ces glucosinolates a montré de grandes différences génotypiques dans la collection étudiée pour les deux glucosinolates principaux chez la moutarde brune, la gluconapine sinigrine. Ce résultat n'était pas attendu. En effet, il est bien connu que le glucosinolate dominant chez la moutarde brune est la sinigrine comme indiqué précédemment dans plusieurs études (Bodnaryk 1997 ; Wu et al., 2001 ; Ragkadiok et al., 2002 ;

Merah et al., 2004). Par ailleurs, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les glucosinolates totaux et niveau sinigrine dans notre étude. Ce surprenant de ne pas association observée ici est probablement dû à la grande variabilité génétique au sein de la collection. Les lignes étudiées ont été fournies par les différents programmes nationaux de sélection originaires principalement des pays asiatiques. Dans ces régions, l'intérêt majeur est la production et l'utilisation de variétés à faible teneur en glucosinolates mais à forte teneur en huile.

Notre collection est composée de deux groupes, qui diffèrent par leurs teneurs en glucosinolates et en sinigrine (données non présentées). Des analyses statistiques plus poussées sont nécessaires pour expliquer ces résultats.

Les relations observées entre la durée du remplissage du grain (DM) et les teneurs en différents glucosinolates (GLS totaux, GNP et le SIN signifient que les géotypes qui ont une plus longue durée de maturation sont plus riches en glucosinolates totaux, principalement en GNP et sont les plus pauvres en sinigrine. De la même manière, les semences lourdes (PMG élevé) semblent plus pauvres en sinigrine selon la corrélation négative observée entre PMG et SIN (Tableau 2). En revanche, les plantes hautes sont plus riches en sinigrine et plus pauvres en GNP (Tableau 2). Ces corrélations intéressantes ont été, jusqu'à présent, pas abordés dans la littérature et les explications biologiques de ces corrélations ont besoin d'être confirmées par d'autres études. Cependant, on peut supposer que l'association entre la hauteur de la plante et la SIN résulte de la relation positive entre la

biomasse végétative (non mentionnée ici) et la hauteur de la plante remarqué dans d'autres études (Das et al., 1998 ; Ghosh et al., 2001 ; Mahla et al., 2003). Les études antérieures ont montré que la teneur en SIN des semences est positivement liée à la teneur de celle-ci dans les tissus verts (Juerges et al., 1980 ; Xu et al., 1983), suggérant qu'une partie de sinigrine de semences a été fournie par la translocation de celle-ci à partir des tissus verts.

De larges différences génotypiques ont également été observées pour les caractères agronomiques. Des valeurs semblables ont été signalés dans les collections de moutarde brune chinoises et indiennes (Chauhan et al., 2003 ; Wu et al., 2001). Ces auteurs ont également montré que le PMG est la composante du rendement la plus importante ce qui est confirmé dans notre étude selon la corrélation positive et significative observée entre le PMG et le rendement. D'autres travaux ont rapporté des associations similaires entre le rendement et les composantes du rendement (Das et al., 1998 ; Ghosh et al., 2001 ; Mahla et al., 2002 ; Merah et al., 2004).

En conclusion, nos résultats fournissent les preuves de l'existence d'une large variabilité génotypique dans la collection étudiée de moutarde brune pour les teneurs en glucosinolates totaux, en sinigrine et en gluconapine dans les graines. Ces résultats présentent un intérêt pour l'exploitation des graines pour la production de la moutarde condiment "moutarde de Dijon" mais également pour l'utilisation en biofumigation comme la farine de graines ou de farine dégraissée comme conseillé par Mari et al. (2002). L'étude de certaines corrélations intéressantes entre les différents glucosinolates et traits agronomiques doit être approfondie. En outre, les relations entre les profils de glucosinolates dans les graines et les différents organes verts contribueront à accroître nos connaissances et aideraient notre compréhension des relations biologiques entre ces traits. Certains géotypes étudiés ont montré des niveaux élevés de glucosinolates et en sinigrine et pourraient être utilisés pour des expériences de biofumigation ou être introduit dans les programmes d'amélioration des teneurs en glucosinolates.

References

- Agnihotri A., Kaushik N., 2003. Towards nutritional quality improvement in Indian mustard (*Brassica juncea* [L.] Czern and Cross) var. Pusa Bold. 11th International rapeseed congress. 6 -11 July 2003, Copenhagen, Danmark. pp. 501-503.
- Bodnaryk R.P., 1997. Will low-glucosinolate cultivars of the mustards *Brassica juncea* and *Sinapis alba* be vulnerable to insect pests? *Can J Plant Sci.*
- Brown P.D., Morra M.J., 1997. Control of soil borne plant pests using glucosinolates containing plants. *Adv Agron* 61, 167-231.
- Chauhan J.S., Tyagi M.K., Kumar S., Tyagi P. Singh N.B., Yadav S.K., 2003. Development, selection and characterization of low erucic acid, low glucosinolates lines in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). 11th International rapeseed congress. 6-11 July 2003, Copenhagen, Danmark. p. 496.
- Das K., Barua P.K., Hazarika G.N., 1998. Genetic variability and correlation in Indian mustard. *J Agric Sci Soc North East Ind* 11, 262-264.
- Inderjit K., Keating K.I., 1999. Allelopathy: principles, procedures, processes and promises for biological control. *Adv Agron* 67, 141-231.

- Jain A., Bhatia S., Banga S.S., Prakash S., Lakshmikumar M., 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationships to heterosis. *Theor Appl Genet* 88, 116-122.
- Juerges K., Thies W., 1980. Quantitative analysis of the indole glucosinolates content in seeds and leaves of *Brassica napus* and *Brassica campestris*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 84, 168-178.
- Kirkegaard J.A., Sarwar M., 1999. Glucosinolate profiles of Australian canola (*Brassica napus annua* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: implications for biofumigation. *Aus J Agric Res* 50, 315-324.
- Lionneton E., Aubert G., Ochatt S., Merah O., 2004. Candidate gene approach and QTL mapping identified loci involved in glucosinolate biosynthesis in brown mustard. *Agroindustria* 3, 343-345.
- Mahla H.R., Jambhulkar S.J., Yadav D.K., Sharma R., 2003. Genetic variability, correlation and path analysis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. *Ind J Genet Plant Breed* 63, 171-172.
- Marchetti R., Lazzeri L., Malaguti L., 2004. Soil carbon and nitrogen content in biofumigated crops. 1st International symposium, Biofumigation: a possible alternative to methyl bromide. 31 March -1 April 2003, Florence, Italy. pp. 47-48.
- Mari M., Leoni O., Iori R., Cembali T., 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathol* 51, 231-236.
- Merah O., Guinet T., Tittone E.D., Alcaraz G., 2004. Genetic diversity for glucosinolates, oil and agronomical traits in brown mustard (*Brassica juncea* L.). *Agroindustria* 3, 339-341.
- Nancé J.M., Ribera I., Zicola J., Raffy E., Urruty N., Bardou H., Beaudoin C., Merah O., 2012. Chemical composition and antifungal activity of brown mustard (*Brassica juncea*) biomass. *Agrobiologia* 2, 34-37.
- Ogbonnaya F.C., Halloran G., Pang E., Gororo N., 2003. Molecular analysis of genetic diversity in *Brassica juncea* and *B. nigra* germplasm accessions. 11th international rapeseed congress. 6 -11 July 2003, Copenhagen, Denmark. p. 489-491
- Quinsac A., Dechambre J., Krouti M., Sausse C., Reau R., Wagner D., Garric B., 2004. Screening of diverse field grown Brassicaceae cultivars according to their biofumigation potential. 1st International symposium, Biofumigation: a possible alternative to methyl bromide. 31 March - 1 April 2003, Florence, Italy. Pp. 8-9.
- Rangkadilok N., Nicolas M.E., Bennett R.N., Premier R.R., Eagling D.R., Taylor P.W.J., 2002. Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var *italica*). *Sci Horti* 96, 11-26.
- Sodhi Y. S., Mukhopadhyay A., Arumugam N., Verma J. K., Gupta V., Pental D., Pradhan A. K., 2002. Genetic analysis of total glucosinolate in crosses involving a high glucosinolate Indian variety and a low glucosinolate line of *Brassica juncea*. *Plant Breed* 121, 508-511.
- Van Os G.J., Bijman V., De Boer M., Breeuwsma S., Van Der Bent J., Lazzeri L., 2004. Biofumigation against soilborne fungal diseases in flower bulbs. 1st International symposium, Biofumigation: a possible alternative to methyl bromide. 31 March -1 April 2003, Florence, Italy. Pp. 20-21.
- Velasco L., Becker H.C., 2000. Variability for seed glucosinolates in a germplasm collection of the genus *Brassica*. *Genet Resour Crop Evol* 47, 231-238.
- Wu X.M., Chen B.Y., Wang H.Z., Xu K., Zheng P.Y., Song Y.C., 2003. AFLP analysis of genetic diversity of Chinese *Brassica juncea*. 11th international rapeseed congress. 6-11 July 2003, Copenhagen, Denmark. p. 487
- Wu X.M., Xu K., Wang H.Z., Zheng P.Y., Chen B.Y., Song Y.C., 2001. Genetic diversity and phylogeny of Chinese Xijiang wild rape, *sinapis arvensis* and *Brassica nigra*. *Chin J Oil Crop Sci* 23, 1-6.
- Xu Y.J., Zhu L., Sun M.G., Gian M.Z., Chen F.R., 1983. Glucosinolate content of the rape plant and organs in various growing periods and its early prediction. *Acta Agron Sinica* 9, 107-116.
- Zukalová H., Vašák J., Nerad D., Štranc P. 2002. The role of glucosinolates of *Brassica* genus in the crop system. *Rostlinná výroba* 48, 181-189.