

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO



ECOLE DOCTORALE AGRICULTURE- ELEVAGE-ENVIRONNEMENT

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

La Biofortification en zinc du riz de bas-fonds à Madagascar

Par RAKOTONDRAMANANA Mbolatantely Fahazavana

Soutenu le : 10 Octobre 2023

Composition du Jury :

Président du Jury
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Examinateur interne
Examinateur externe
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Encadrant
Encadrant







"…Ianao Jehovah Tompo o, no nataoko aroko, mba hilaza ny asanao rehetra aho" Sal 73,28b

Remerciements

Merci **Jésus** pour la grâce que tu m'as donné d'avoir eu la chance de travailler sur ce thème très enrichissante.

Je tiens à remercier le Projet **Fy Vary** d'avoir mis tous les moyens financières et techniques pour l'accomplissement de cette étude en particulier le coordonnateur du projet **Dr Tsujimoto.** Je suis très reconnaissante pour les moyens mise à ma disposition pour la mise en œuvre des essais expérimentales et les analyses effectuées au laboratoire. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'effectuée mes travaux de laboratoire au Japon. Un grand Merci pour l'**équipe de JIRCAS** pour leurs accueilles chaleureux et pour toutes les compétences acquises aux cours de mes visites.

J'adresse ma gratitude au **Pr Wissuwa**, un long parcours avec beaucoup de compréhension, de générosité et de partage de connaissance. Merci du fond du cœur pour tous les précieux temps et dévouement dont vous nous avez donné en nous formant. Merci de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la recherche scientifique.

Un grand merci aussi est adressé au Pr **Cécile Grenier** pour l'encadrement, les encouragements, la patience et les enseignements sur les analyses statistiques sophistiquées que tu m'as donnés. Je suis très reconnaissante.

Je remercie aussi **Pr Tantely Razafimbelo** pour l'accompagnement, l'encouragement, la patience et tous les conseils constructifs octroyés durant ces 3 années de thèse. Merci aussi à **Dr Landiarimisa Ramanakaja** pour votre dévouement et passion pour la présente étude. Vos directives ont fait que ce travail est arrivé à son terme.

Un grand merci au **FOFIFA** de toutes les opportunités et accueilles dans la mise en œuvre de cette étude au sein du projet FyVary.

Mes remerciements sont aussi adressés aux techniciens perfectionnistes qui ont fait le succès de ce travail : **Mr Patrick, Anny, Franck, Salotra**. Aussi mes reconnaissances sont tournées vers l'Université de Flinders en Australie pour la collaboration spécialement le **Pr James Stangoulis** pour les analyses ICP. Ainsi que **Kirsten Von Brocke** du **CIRAD** pour les appuis techniques et financières.

Et surtout un grand merci à toute ma famille : **mon mari, mes parents, mes beaux-parents, ma sœur** pour vos soutiens tout au long de ces longues années. Merci pour vos appuis psychologiques et encouragements.

Merci **Nicole Ranaivo** et **Juan-san** d'avoir été près de moi et de m'avoir aidé à faire face aux différents obstacles rencontrés durant ces 3 années de thèse.

Table des matières

PARTIE 1 : Etat de l'art1
I-1 Sécurité alimentaire à MadagascarErreur ! Signet non défini.
I-2 Les éléments nutritifs constituant le grain de riz5
I-3 Métabolisme du zinc5
I-4 Les besoins physiologiques en zinc6
I-5Les effets de la carence en zinc
I-6Apports et interventions faites pour pallier la carence en zinc9
I-6-1 Apport directe de zinc9
I-6-2 Fortification des aliments de bases9
I-6-3 Les interventions agronomiques :10
I-6-4 Origine du Zinc dans le sol11
I-6-5 Les formes de Zinc dans le sol12
I-7 La Biofortification liée à l'amélioration variétale13
I-7-1 Mécanisme d'absorption de zinc par la plante15
I-7-2 Transport de zinc intra-racinaire
I-7-3 Translocation du zinc du système vasculaire et allocation aux différents16
I-7-5 Genès associés à la biofortification en Zn du riz17
I-7-6 La réduction de rendement relative à la biofortification. Erreur ! Signet non défini.
I-8 Objectifs et hypothèse de l'étude Erreur ! Signet non défini.
PARTIE 2: Genomic prediction of zinc-biofortification potential in rice gene bank accessions*
II-1 Résumé
II-2 Introduction

II-3 Materials and methods	24
II-3-1-Field phenotyping	24
II-3-2-Grain processing and grain Zn analysis	25
II-3-3-Statistical analysis for phenotypic values	26
II-3-4-Genomic data and Genome Wide Association (GWA) analysis	27
II-3-5-Genomic prediction	
II-3-6-Confirmatory experiments	
II-4 Results	29
II-4-1-Phenotypic variation	29
II-4-2-Genome-wide associations for grain Zn concentrations	31
II-4-3- Genomic prediction for grain Zn concentrations	34
II-5 Discussion	
II-5-1-Differences between rice sub-populations	
II-5 -2- GWA and GP analysis	40
II-6 Conclusions	42
PARTIE 3: Stability of grain Zn concentrations across lowland rice environments of	
Madagascar favors zinc biofortification breeding. *	43
III-1 Resumé	43
III-2 Introduction	44
III-3 Materials and Methods	47
III-3-1 Evaluation sites and years	47
II-3-2 Experimental materials	48
III-3-3 Experimental layout and management	51
III-3-4 Statistical analysis	52

III-4 Results	53
III-4-1- Baseline zinc concentration of local check varieties	53
III-4-2- Effects of genotype (G) and environment (E) on grain yield and grain zinc concentrations in year1	55
III-4-3-Field experiments in year 2	58
III-5-Discussion	63
III-5-1- Baseline Zn and breeding targets for Madagascar	63
III-5-2 - Levels of Zn in local varieties and breeding lines	65
III-5-3- Stability of Zn across environments, years and treatments	66
III-5-4-Breeding Zn biofortified rice for Madagascar	67
III-6-Conclusions	69
PARTIE 4 : Le zinc dans la plante et son accumulation dans les grains de riz	69
IV-1- Introduction	70
IV-2- Matériels et méthodes	72
IV-2-1- Dispositifs expérimentaux	72
IV-2-2- Calculs et analyse statistique	74
IV-3- Résultats	74
IV-3-1- Zinc dans la plante	74
IV-3-2-Absorption et translocation pendant le remplissage du grain	78
IV-3-3-Chargement de zinc dans les graines durant le remplissage de grains	79
IV-4-Discussion	84
IV-4-1-L'absorption de zinc du sol a la biomasse aérienne	84
IV-4-2-La teneur en zinc et la concentration en zinc au cours du remplissage de grain	ı85

IV-4-3-Les stratégies d'absorption et de transfert de zinc du sol dans les plantes et les panicules dépendent des variétés	35
IV-4-4-Le transfert de zinc dans les grains se fait en grande partie dès le début du remplissage des grains	37
IV-5-5-La barrière de l'augmentation de la concentration en zinc dans X265 se remarque au niveau du transfert de zinc dans le grain	e 38
IV-5-Conclusion	39
PARTIE 5 : Discussion et conclusion générales9	<i>•</i> 0
V-1 Discussion générale9	<i>•</i> 0
V-1-1 Sélection d'un donneur9)1
V-1-2 La concentration en zinc est un caractère stable9)2
V-1-3 X265: une variété locale améliorée avec un bon rendement mais une faible teneur en zinc dans les grains9)3
V-1-4 Programme de sélection approprié pour la concentration en zinc9)3
V-2-Conclusion Générale9)5
V-2-1 Limites et perspectives d'étude9	96

Abstract

One-third of the human population consumes insufficient quantities of zinc (Zn) to sustain a healthy life. Especially infants in countries like Madagascar at risk of Zn deficiency because their dominant food source, rice, contains insufficient Zn Increasing Zn concentrations in edible parts of food crops, an approach termed Zn-biofortification, is one cost-effective option to address this problem. Breeding biofortified rice varieties with increased grain Zn concentrations would offer a solution and our objective is to explore the genotypic variation present among rice gene bank accessions compared to Zn-biofortified breeding lines and local varieties. A second objective was to investigate to what extent genotype, environment and their interactions contribute to variation in grain Zn concentrations. And third to compare the flux of zinc from biomass to grain in order to assess the bottleneck of biofortification and provide solution to increase zinc in the grain. To possibly identify underlying genetic factors explaining grain Zn concentrations and grain yield, through genomic prediction and genome-wide association studies (GWAS), A training set of 253 rice accessions was grown at two field sites in Madagascar. Accessions from the aus sub-species had the highest predicted grain Zn concentrations and these were confirmed in additional field experiments. In gene-bank accessions grain Zn concentrations up to 40 ppm were detected, especially in accessions belonging to the aus subspecies of rice native to the Indian subcontinent: IRIS9368. Across sites and seasons variation in grain Zn was attributed to 76 - 78% by genotype (G) effects with much smaller contributions by the environment (E) and genotype by environment interactions (GEI). This rather high stability of grain Zn differences across sites and years contrasted with dominant E and GEI contributions to grain yield. This has positive implications for Znbiofortification breeding. High-Zn gene-bank accessions and breeding lines identified here represent suitable donors and have been crossed to locally preferred varieties in an effort to develop healthier rice varieties that can alleviate Zn malnutrition in Madagascar and other countries relying predominantly on rice in daily diets. More physiological investigation has been conducted in order to know the bottleneck of transfer of zinc in the grain of the common local variety X265 and to determine the reason of the higher grain zinc in the AUS. The zinc uptake from soil to roots and biomass is not limiting. The concentration of zinc in each part of the plant is related to the genotypes. The concentration of zinc in the biomass is high for all the genotypes in zinc efficiency soil condition. Some lines like IRIS10114 got higher zinc absorption during vegetative stage with 50% of the zinc in the grain. And the others like X265 prefer to load zinc during the reproductive stage. The transfer of zinc from biomass to grains by direct uptake or translocation is the bottleneck of zinc biofortification. The zinc loading in the grain is specific to each genotype However most of the grain zinc loading is during the first 2 weeks after flowering. This study offers more perspectives to improve the strategies of biofortification in order to enhance the concentration of zinc in the grain. Understanding these Zn transfer mechanisms in rice grains is crucial for targeted donor selection and also for establishing fertilizer and irrigation management strategies to obtain Zn-rich rice grains

Key-word: Zinc concentration, donors, Genotype environment interaction, zinc stability, zinc loading.

Résumé

Un tiers de la population mondiale consomme des quantités insuffisantes de zinc (Zn) pour maintenir une vie saine. En particulier, les nourrissons dans des pays en voie de développement tels que Madagascar sont exposés au risque de carence en Zn car la principale source alimentaire de la population, le riz, contient des quantités insuffisantes de Zn. Une approche appelée biofortification, est une option rentable pour résoudre ce problème. L'amélioration variétale par croisement de variétés de riz avec des concentrations élevées de Zn dans les grains offrirait une solution durable. Notre objectif est d'explorer la variation génotypique présente parmi les accessions des banques de gènes de riz en vue de la détection des potentiels donneurs. Un deuxième objectif est d'étudier dans quelle mesure la variété, l'environnement et leurs interactions contribuent à la variation des concentrations de Zn dans les grains. Et enfin, comparer le flux de zinc de la biomasse vers le grain afin d'évaluer les barrières de la biofortification et de fournir des solutions adéquates pour augmenter la concentration en zinc dans le grain. Pour identifier les éventuels facteurs génétiques sous-jacents expliquant les concentrations de Zn dans les grains et le rendement, par le biais de la prédiction génomique et des études d'association génomiques (GWAS), un ensemble de 253 accessions de riz a été cultivé sur deux sites à Madagascar. Les accessions de la sous-espèce AUS présentent les concentrations prédites les plus élevées en Zn dans les grains. Dans la banque de gènes de l'IRRI, des lignées ayant des concentrations de Zn dans les grains allant jusqu'à 40 ppm ont été détectées, en particulier dans les accessions appartenant au sous-espèce AUS, originaire du sous-espèces Indica : IRIS9368. À travers les sites et les saisons, la variation de la concentration en Zn dans les grains était attribuée à 76-78% aux effets de la variété (G), avec des contributions beaucoup. Les accessions de la banque de gènes à teneur élevée en Zn sont des donneurs adaptés et ont été croisées avec des variétés locales les plus cultivées par les producteurs dans le but de développer des variétés de riz plus nutritive pouvant remédier à la malnutrition en Zn à Madagascar et dans d'autres pays dont l'alimentation quotidienne repose principalement sur le riz. Des études physiologiques supplémentaires ont été menées afin de connaître les barrières du transfert de zinc dans le grain de la variété locale courante X265. L'absorption de zinc du sol vers les racines et la biomasse n'est pas limitante étant donnée la concentration en zinc élevée des biomasses aériennes des variétés étudiées. La concentration en zinc dans chaque partie de la plante est toutefois liée et dépende en grande partie des variétés. Certaines variétés, comme

l'IRIS10114, ont une absorption de zinc plus élevée pendant la phase végétative, avec un transfert de 50% du zinc dans le grain. D'autres lignées, comme X265, préfèrent transférer le zinc pendant la phase reproductive. L'absorption de zinc par les racines et le transfert dans les tiges et feuilles n'étant pas limitants, le transfert de zinc de la biomasse vers les grains constitue la plus importante barrière de la biofortification en zinc. Le transfert de zinc dans le grain est spécifique à chaque variété cependant une grande partie du zinc dans le grain est transférée dans le grain au cours des deux premières semaines après la floraison. Cette étude offre ainsi de nouvelles perspectives pour les stratégies d'améliorations des variétés de riz axées sur l'augmentation de la concentration de zinc dans le grain. La compréhension de la stabilité de la concentration en zinc du riz et de ces mécanismes de transfert dans les grains est essentielle pour la sélection ciblée des donneurs et pour établir des stratégies de gestion des engrais et de l'irrigation en vue d'optimiser l'augmentation de la teneur en zinc dans les grains.

Mot-clés : Concentration en zinc, donneurs, interaction génotype environnement, stabilité du zinc, transfert en zinc.

Fintina

Ny ampahatelon'ny mponina eto an-tany dia tsy ampy ny singa zinka (Zn) ka misy fiatraikany amin'ny fahasalamanany izany. Ny zazakely any amin'ny firenena toa an'i Madagasikara no tena atahorana ho voan'ny tsy fahampian'ny Zn satria tsy ampy Zn ny vary izay fototsakafony. Ny fampitomboana ny fatran'ny Zn amin'ny foto-tsakafo, no antsoina hoe "Zn-biofortification". Izy io dia fomba iray mahomby hiadiana amin' ity tsy fanjarin-tsakafo ara-kalitao ity. Ny fambolena vary voavoatra misy zinka any anatin'ny fotsimbary dia hinoana fa hanome vahaolana ny amin'izany. Ny tanjon'ity fikarohana ity dia ny hijery, handalina ary hampitaha ireo fototarazo misy ao amin'ny ireo karazam-bary izay voatahiry any amin'ny IRRI sy ny karazam-bary fambolin'ny tantsaha isan-taona. Ny tanjona faharoa dia ny fandalinana ny fifandraisan'ny fototarazo, ny tontolo ambolena azy amin'ny fiovaovan'ny fatran'ny Zinka any anaty voambary. Ary fahatelo ny fampitahana ny fikorinan'ny zinka avy amin'ny taho sy ny ravim-bary makany amin'ny voany mba hanombanana ireo olana tsy hahatanterahan'ny "biofortification". Izany no hatao mba hanomezana koa vahaolana amin'ny fampitombona ny zinka ao anatin'ny voambary. Mba hamantarana ny fototarazo fototra manazava ny habetsahan'ny Zn ao amin'ny voambary sy ny fototarazo fototra manazava ny voka-bary ambony, amin'ny alalan'ny "Genomique Selection" sy ny" Genomique Wide Association Study" (GWAS), dia nisy karazam-bary 253 nambolena tamin'ny toerana roa teto Madagasikara. Ny famakafakana GWAS dia nahitana fototarazo valo. Ny vondrona aus no vary betsaka Zn indrindra ao amin'ny voambary. Ao amin'ny ireo karazambary maro isa anefa dia nahitana vary iray mahatratra hatramin'ny 40 ppm ny Zn ao amin'ny voambariny: IRIS9368. 76 - 78% amin'ny tahan'ny Zn any anaty voambary dia hazavain'ny fototarazo (G), Ny tontolo ambolena ny vary kosa dia kely dia kely ny anjara asany amin'ny tahan'ny Zn ao amin'ny voam-bary (E) ary ny fifandraisan'ny fototarazo sy ny tontolo ambolena azy mitambatra dia vao maika kely ny anjara asany (GEI). Fanandramana lalindalina kokoa no natao hahafantarana ny antony tsy fahampian'ny Zn ao amin'ny voan'ny X265 sy hamaritana ny anton'ny maha be Zn ny vary ao amin'ny vondrona AUS. Hita tamin'izany fa ny fitrohana Zn avy ao anaty tany dia miankina tanteraka amin'ny karazam-bary. Ny Zn ao anaty tahom-bary sy raviny dia ambony ho an'ny karazam-bary rehetra. Ny karazam-bary sasany toa an'i IRIS10114 dia mampiakatra ny 50% ny Zn ao amin'ny voa mandritry ny roa herinandro ao aorian'ny famelanan'ny vary, ary ny karazambary hafa toa ny X265 dia misafidy ny mameno Zn ny voa ao aorian'ny izay roa herinandro izay. Hita taratra tamin'ny voka-pikarohana fa ny olana lehibe maha tsy ampy Zn any amin'ny voa ny tsy fifindran'izany Zn izany ao anaty voam-bary ao aorian'ny famelanan'ny vary. Izany anefa dia miankina tanteraka amin'ny karazam-bary. Ity fikarohana ity dia manolotra ny paikadin'ny "biofortification" mba hanatsarana ny Zn amin'ny voam-bary.

Ny fahalalana ireo fikorinan'ny Zn ho any amin'ny voam-bary dia tena ilaina amin'ny fifantenana ireo mety ho karazambary hiavin'ny karazam-bary vaovao ary koa amin'ny fanatsarana ireo teknikam-pamokarana (fampiasana zezika, fanondrahana...) hampitombo ny tahan'ny singa Zn any amin'ny voam-bary.

Fitambaran'ny teny fototra: zinka, karazam-bary azahoana vary vaovao, Fifandraisan'ny fambolena sy ny tarazoka, tsy fiovan'ny tahan'ny zinka, fikorinan'ny Zn ho any amin'ny voambary.

Listes des abréviations

Zn : Concentration en zinc GY : Grain Yield, rendement en grains SWT : Shoot Weight, poids de la biomasse HD: Heading date, date d'épiaison AZ: Ankazomiriotra AJ: Anjiro IZiNCG: Groupe consultatif International sur la nutrition en zinc EAR : Estimated average requirement ADN: Acide Desoxyribonucleique ARN : Acide Rubonucleique MMP : poudres de Multi-Micronutriments MAP : phosphate monoammonique DAP : phosphate diammonique NPK : Nitrogen Phosphorus Potassium BPI : Indice de Priorisation en Biofortification DMA: l'acide désoxymuginique ZIP : zinc iron regulated-like transporter Os ZIP: Oryza Sativa zinc iron regulated-like transporter OsIRT1: Oryza Sativa Iron Regulatoer Transporter OsHMA: heavy metal atpase NA: Nicotianamine ESI-TOF: Electrospray ionization Time of Flight MAS : la Sélection Moléculaire assistée par Marqueurs QTL: quantitative Trait Loci QTN : Quantitative Trait Nucleotides **PEV** : Phenotypique Variance Explained LOD:Logarithm of the odds, SNPs: Mononucléotides polymorphismes GWAS : études d'association à l'échelle du génome, GS :sélections génomiques **GP** : Prediction Genomique GEBV : valeurs génétiques estimées **IRRI** : International Rice Research Institute SDG : Sustainable Development Goals

CGIAR: Consultative Group on International Agricultural Research OsNAS: Oryza Sativa NA synthase genes DH: double-haploid PA: predictive ability CIAT: International Center of Tropical Agriculture METs: multi-environment trials BLUE : Best linear unbiased estimated SVP: singular value symmetrically partitioned GEI: Génotype Environnement interaction GGE : Genotype-Genptype x Environnement RILs: Recombinant Inbred Lines HI: Harvest Index DAF: Day after flowering ICP :inductively coupled plasma mass spectrometry BF: Biofortified

Listes de figures

Figure 1: Classement mondial de la priorisation de la biofortification en riz14 Figure 2:Repartition and correlation of zinc concentration (Zn), grain yield (GY), shoot weight Figure 3:Variation in grain Zn concentrations in accessions from five rice sub-populations: a measured data of the training set (n=253); b predicted values of the entire 3 K set using the full training set (n=253); c predicted values of the entire 3 K set using a training set Figure 4:Grain Zn concentrations for the two allelic groups in the fve sub-populations for QTN_2.1, QTN_8.1, QTN_11.2 and QTN_11.3. Num bers above bars indicate the number Figure 5:Predicted grain Zn concentrations of the entire 3 K set of accessions available at the IRRI gene bank based on two different training sets. Predictions shown on the x-axis are based on the entire set of 253 accessions tested in Madagascar, whereas predictions on the y-axis are based on only 247 accessions with all six members of the aus sub-population Figure 6:Independent validation of predicted grain Zn concentrations in a set of 61 accessions

imported from the IRRI gene bank. Predicted values are based on the training set of 253

- Figure 10: Means VS Stability, a GGE biplots for Grain Yield (a) and for grain zinc concentration (b) showing components 1 and 2 explaining the total variation using Symmetrical SVP and Tested-centered G+GE with scaling by standard deviation, Year 1.

Liste des Tableaux

Tableau 1:Apport recommandé en zinc en fonction du genre et de l'âge, en mg/jour......6 Tableau 2:Facteurs influençant la résorption du zinc7 Tableau 4: Environments used for the evaluation of grain yield and grain Zn concentrations during the main and off seasons of 2018 and 2019. The main season corresponds to the rainy season (November-May) in the highlands whereas the off-season in the coastal region from June - October relies entirely on irrigation. Temperatures and rainfall are given for Tableau 6:Distribution of grain yield (GY) and grain zinc concentration (Zn) among the six Tableau 7:Partition of variance for grain yield (GY) and grain zinc concentration (Zn) in the Tableau 8:Partition of variance for grain yield (GY) and grain zinc concentration (Zn) in the Tableau 9: Teneur de Zinc absorbée par la plante tout au long du stade de remplissage de grains, le coefficient de zinc transféré dans le grain ainsi que les indices de récoltes relatives au poids des grains et de la teneur en zinc transmis dans les grains. Les groupements sont Tableau 10: Analyse de la variance (ANOVA) de la concentration en zinc (Zn), du poids de 1000grains (1000WT) et de la teneur en Zinc (ZnCont) de 6 variétés de riz en fonction des sites d'intervention (Anjiro et Behenjy). Sous traitements NPK et sans apport de fertilisation pour différents temps de prélèvement (Jour après Floraison DAF).80

Listes des annexes

Annexe1 : La liste de tous les QTN détectés avec un LOD>3 pour les 6 types d'approches de multiloci.

Annexe 2 : Diagramme de Manhattan résumant les associations détectées à l'aide de six approches multi-locus. Les pics en rose identifient les associations détectées avec un LOD > 3,0 par au moins deux approches (les valeurs de LOD en rose sont les médianes des approches significatives).

Annexe 3 : Relation entre les marqueurs SNP dans la région s'étendant de 28,609 à 28,998 Mbp sur le chromosome 11. Deux blocs de liaison peuvent être discernés ; le bloc de gauche marqué par le triangle rouge (28,681 - 28,798 Mbp) contient le marqueur de pic (C11-28757650) identifié par GWAS multi-emplacement, ainsi que plusieurs autres marqueurs significativement associés à des concentrations élevées de Zn dans les grains.

Annexe 4 : Top 20 des accessions en termes de concentration de Zn prédites à l'aide du modèle complet.

Annexe 5 : Prévision des concentrations de Zn dans les grains en utilisant l'ensemble d'apprentissage complet (n = 253) par rapport à l'ensemble d'apprentissage excluant l'accession potentiellement influente IRIS_313_9368 ou les six accessions aus.

Annexe 6 : Performances moyennes des groupes de variétés (moyennes ± écart-type) pour GY et Zn mesurées dans les quatre environnements de l'année 1.

Annexe 7 : Effet de l'engrais NPK sur les 7 sites au cours de l'expérimentation de la deuxième année pour la concentration en zinc du grain (a) et le rendement en grain (c) avec 5 sites (ANJ2a, ANJ2b, ANK2, BEN2a et BEN2b) du haut plateau et 2 sites (MAR2a et MAR2b) de la zone côtière Nord-Ouest. L'effet du traitement d'engrais NPK sur les 10 variétés dont 5 riz biofortifié, 2 lignées d'iris de la banque de gènes IRRI et 2 contrôles X265 et IR64 est montré pour la concentration en zinc du grain (b) et le rendement du grain (d) sous la deuxième année expérience.

Annexe 8 : Performances moyennes de tous les variétés testées pour GY et Zn (moyennes \pm écart-type) dans les sept environnements et les deux conditions de fertilisation durant l'année2.

Annexe 9 : Le biplot GGE 'Which WonWhere/What' du rendement pour la comparaison des variétés sur sept environnements sans apport (a) et avec apport de NPK (b), concentration en zinc sans apport (c) et avec apport NPK (d) au cours de l'année 2 expérience. Les diagrammes bipolaires GGE montrant les composantes 1 et 2 expliquant 72,81 % (a), 60,09 % (b), 94,56 % (c) et 94,22 % (d) de la variation totale. Les biplots ont été créés sur la base de Centering=0, SVP=2, Scaling=0.

Annexe 10 : Corrélation entre poids des grains et concentrations en zinc des variétés IRIS.

PARTIE 1 : Introduction Générale et Etat de l'art

I-1 Introduction Générale

Une nutrition adéquate consiste à consommer 40 nutriments, en quantités différentes, provenant d'une large diversité d'aliments (WFP,2022). Un approvisionnement alimentaire sûr et nutritif est un élément essentiel de la Sécurité Alimentaire afin de maintenir une vie active et saine.

Une multitude d'aliments peut être produite à Madagascar au vu la diversité des sols et du climat. Cependant, Madagascar est très vulnérables aux aléas et changements climatiques, et subit différentes contraintes comme une faiblesse du capital humain, insuffisance et délabrement des infrastructures de production et de communication, accès au foncier, faible utilisation d'intrants et techniques améliorées de production, un faible niveau d'éducation et manques de connaissances , une grande pauvreté se traduisant par le faible pouvoir d'achat et l'accessibilité réduite aux aliments riches en valeurs nutritives surtout en milieu rurales (Dabat et al, 2016). En effet, 92% de la population à Madagascar gagne moins de 2 \$ US par jour, d'où la difficulté de la majorité à s'offrir un régime alimentaire sain et équilibré (INSTAT,2008). Madagascar est un pays majoritairement agricole, et l'agriculture est caractérisé par une agriculture familiale de subsistance, précaire, dont le centre de la production est la riziculture. La surface du territoire occupée par le riz est de 1.450.000 ha (FAOSTAT, 2020). En 2020, la production nationale rizicole est de 4.232.000 tonnes. Cette production est destinée à l'autoconsommation.

Pour couvrir les besoins annuels de la population malagasy, le Gouvernement malagasy importe du riz chaque année. En 2020, 478 340 tonnes de riz cargo, 424 405 tonnes de riz blanc et 48 454 tonnes de farine de riz ont été importés (FAOSTAT,2020). Le riz étant l'aliment de base, à Madagascar, une personne consomme 406 g de riz par jour. Madagascar est le 12 ^{-ème} plus grand consommateur de riz dans le monde et le 2ème en Afrique (FAOSTAT,2020). En effet, les petits producteurs priorisent la riziculture au détriment d'autres cultures comme les légumes dès qu'ils ont un capital foncier disponible tel que terrain de bas fond ou tanety. La riziculture pluviale se répande de plus en plus en raison de la conservation du riz à long terme et de sa consommation quotidienne. La production de légumes nécessite une charge de travail plus élevée pour les producteurs, aussi, une irrigation permanente des champs est nécessaire. Si les petits producteurs arrivent à produire des légumes, c'est en premier lieux destiné à la vente au niveau des villes pour qu'ils puissent ensuite acheter des produits de première nécessité et/ou du riz pour subvenir au besoin annuel de la famille (Ramahaimandimby,2022).

Face à ces différentes contraintes, les petits producteurs ont des systèmes de production très limités et de ce fait, a tendance à se focaliser uniquement sur le riz, entrainant une très faible diversification alimentaire et des carences nutritionnelles importantes. Connu sous le nom de faim cachée, la malnutrition liée au manque de micronutriments résulte d'une alimentation de mauvaise qualité. Elle est caractérisée par une forte consommation d'aliments de base, comme le riz et le maïs, et une faible consommation d'aliments riches en micronutriments, tels que les fruits et légumes. La faim cachée en particulier affecte les populations vivant dans la pauvreté qui souvent n'ont pas les moyens d'acheter des aliments riches en micronutriments. La faim cachée contribue significativement à la charge mondiale de morbidité des enfants en limitant le bon développement cognitif, altérant les capacités physiques développement et augmentant la sensibilité aux maladies infectieuses. Ces problèmes de santé peuvent avoir des effets à long terme sur les moyens de subsistance d'un individu, car ils réduisent considérablement sa capacité à capitaliser sur les opportunités économiques (Black et al. 2003; Alderman, Hoddinott et Kinsey 2006).

La création ou la sélection de variétés avec un rendement élevé et une concentration élevée en Zinc est une solution durable à la malnutrition en termes de quantité et de qualité. Il est à noter que le rendement et la concentration en zinc dans les grains sont des caractères génétiquement complexes et sont fortement influencés par des facteurs environnementaux externes (Zaw et al. 2019 ; Descalsota-Empleo et al. 2019a). Plusieurs études ont montré une corrélation négative entre eux (Gregorio 2002 ; Norton et al. 2010 ; Morete et al. 2011 ; Anandan et al. 2011 ; Nha 2019). Cependant, dans différentes conditions de disponibilité de zinc dans le sol et dans des accessions de variétés aromatiques et locales, une relation positive entre la concentration en zinc et le rendement a été signalé (Wissuwa et al. 2008 ;Gangashetty et al. 2013; Sathisha 2013). De ce fait, l'identification de donneurs stables à haute teneur en Zn avec des rendement acceptable, l'utilisation de méthodes d'amélioration variétale et de stratégies de sélection appropriées est nécessaire pour combiner avec succès ces deux caractères.

L'objectif principale de cette thèse est de mettre en place un programme de sélection des variétés de riz de bas fond ayant à la fois un rendement et une concentration en zinc élevées dans les grains.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Explorer un grand panel de germoplasme de riz avec une grande variabilité génétique en vue de la sélection des donneurs pour la biofortification en zinc à Madagascar.
- Evaluer les variabilités et les interactions entre le rendement et la concentration en zinc des grains de riz dans des essais multisites.
- Déterminer les stratégies physiologiques adoptées par des variétés ayant différent niveau de concentration de zinc dans les grains, en termes d'absorption, de remobilisation et d'accumulation de Zn dans les grains.

D'où les hypothèses suivantes :

- Les donneurs sélectionnés ont une concentration en zinc supérieure à 30

 μ g.g⁻¹ et vont ainsi servir d'amont au programme de recherche variétale de biofortification en Zinc à Madagascar.

- La concentration en zinc et le rendement sont des caractères stables mais pourraient être corrélation négatives dans toutes les expérimentations multisites.

- L'absorption du zinc du sol par la racine, le transfert de zinc dans la biomasse et l'accumulation de zinc dans les grains sont des processus continuent qui s'intensifient en fonction de la concentration du zinc dans les grains à maturité.

Pour répondre à ces objectifs, la présente étude sera divisée en trois étapes faisant intervenir à la fois des expérimentations aux champs et des séries d'analyses de la concentration en zinc dans la plante. Chaque objectif est lié à un chapitre. Ainsi, le Chapitre 2 serait alloué à l'identification de potentiels donneurs en zinc pour la biofortification à Madagascar en utilisant le GWAS (Etude de liaison des génomes) et la GS (Sélection Génomique). Des expérimentions aux champs des producteurs ont été effectuées sur un groupe de 253 accessions venant de la banque de gènes de l'IRRI. A la récolte, les panicules et grains ont été collectes et ont été sujets d'analyse pour leurs concentrations en zinc. Des analyses statistiques pouvant identifier les loci

caractéristiques de la concentration en zinc. Aussi des modèles mettant en relations les données génomiques et phénotypiques des 253 accessions ont été élaborées en vue de prédire la concentration en zinc de 3000 accessions séquencées de la banque de gènes de l'IRRI pour une sélection effective. Le chapitre 3 fait référence à des expérimentations au champ avant comme facteurs plusieurs environnement différents par l'altitude et la fertilité du sol. Des variétés exotiques biofortifées en zinc ont été comparées avec les variétés populaires des environnements étudiés. S'étalant sur 2 ans ces expérimentations sont toujours suivis d'analyses des grains pour la concentration en zinc. Les effets des interactions Environnement* Génotypes sur le rendement et la concentration en zinc vont être étudiées. Pour le chapitre 4, des expérimentations aux champs ont été effectués avec diverses échantillonnages. (a) Echantillonnages des plantes durant l'épiaison et la maturité. De cela découle, le calcul des ratios permettant de quantifier les stratégies physiologiques des donneurs issus du chapitre 2 ainsi que les variétés sélectionnées du chapitre 3 quant à l'absorption et le transfert de zinc dans les grains. (b) Echantillonnages espacées de 4 jours jusqu'à la récolte des grains de riz durant le stade de remplissage des graines. Cela en vue de déterminer les évolutions de la concentration en zinc dans les grains tout au long du stade de remplissage des grains des différentes variétés.

I-2 Les éléments nutritifs constituant le grain de riz

Le grain de riz comporte une enveloppe protectrice - la balle - et en un caryopse ou fruit (Juliano et Bechtel, 1985). Le riz cargo comprend les couches externes du péricarpe, le tégument et le nucelle, ainsi que le germe ou embryon (tissu maternel) et l'albumen (l'endosperme). L'albumen comprend la couche de cellules appelée aleurone, l'albumen proprement dit étant composé de la couche subaleurone (Juliano et Bechtel, 1985). L'amidon est la principale composante du riz usiné, représentant environ 90 pour cent de l'extrait sec. C'est un polymère du glucose D à liaison a-(1-4) et il se compose habituellement d'une fraction essentiellement linéaire, l'amylose, et d'une fraction ramifiée, l'amylopectine. Les protéines de l'endosperme (riz usiné) se composent de plusieurs fractions : 15% d'albumine (soluble dans l'eau), plus globuline (soluble dans les sels), de 5 à 8 % de prolamine (soluble dans l'alcool) et le reste de glutéline (soluble dans les alcalins) (Juliano, 1985). La teneur du riz en lipides ou matières grasses est principalement dans la fraction constituée par le son (20 % de l'extrait sec). Le riz usiné contient 1,5 à 1,7 % de lipides. La teneur en Zn et en Fe est le plus faible dans les grains de riz soient 0.6 et 0.7 mg/100g de matière sèche. Selon les études récentes de Lu et al.,2018, 56.6% du Zinc dans le riz se trouve dans l'albumen alors que 19.6% et 23.8% se trouve respectivement dans la balle de riz et le son. Le Zinc a été classé par la communauté internationale de la nutrition parmi l'un des 3 micronutriments (Vitamine A, Fer et Zinc) les plus limitants dans l'alimentation humaine (Black et al. 2013).

I-3 Métabolisme du zinc

Le zinc est un élément essentiel pour le corps humain. Il intervient dans plus de 300 réactions enzymatiques aussi bien dans des réactions catalytiques que structurelles (Tapeiro and Tew, 2003). C'est un métal lourd que le corps ne produit pas mais devrait être apporté de l'extérieur par l'alimentation. L'organisme ne dispose d'aucune réserve notable de zinc, raison pour laquelle un apport régulier par l'alimentation est indispensable. Les ions Zn²⁺ sont hydrophiles. L'iléon est le site d'absorption d'ions de Zn dans l'intestin, dans le duodénum et jéjunum (intestins), l'absorption active de zinc à plusieurs étapes : le zinc entre par la membrane apicale, migre à travers le cytoplasme, jusqu'à la membrane basale d'où il est transporté dans le système de circulation sanguin (Yu et al., 2008).

Après pénétration à l'intérieur de l'épithélium intestinal (enthérocytes), il est complexé par des ligands organiques comme l'albumine ou quelques acides aminés, de cette façon, le zinc est facilement échangeable et se lie à diverses protéines tissulaires «les métallothionéines» dans le foie et dans les reins. Une faible partie du zinc est piégée au niveau de l'alpha macroglobuline et ne peut se dissocier qu'au niveau du foie (Gordon et al., 1981).

Le zinc est distribué dans tous les organes : 85 % dans le muscle et l'os, 11 % dans la peau et le foie, le reste dans les autres organes. La totalité du Zn se trouve à l'intérieur des cellules : 30 % à 40 % dans le noyau, 50 % dans le cytoplasme, les organites et les vésicules spécialisées (enzymes digestives ou hormones) et le reste dans la membrane cellulaire (Tapiero, 2022).

Le Zn est le seul métal impliqué dans les six classes d'enzymes : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lysases, les isomérases et les ligases (Barak et Helmke, 1993). Les ions Zn sont également des neurotransmetteurs et sont présents dans les cellules des glandes salivaires, de la prostate et du système immunitaire (Sharma et al., 2012). Le Zn joue un rôle clé dans la croissance et le développement, le fonctionnement du système immunitaire, la santé reproductive, les fonctions sensorielles et le développement neurocomportemental. Le Zn est un composant intégral des protéines régulant la transcription de l'ADN (Levenson et Morris, 2011).

I-4 Les besoins physiologiques en zinc

Les besoins en zinc chez l'homme selon l'Organisation Mondiale de la Sante est de 12,8 à 54,5 mg /j. Ces sources de zinc peuvent provenir de divers aliments. Le Groupe consultatif International sur la nutrition en zinc (IZiNCG) a estimé les besoins moyens en zinc (Estimated average requirement : EAR) qui dépendent du genre, de l'âge et de l'état de l'individu (Tableau1).

	0-4 mois	4–12 mois	1-4 ans	4-7 ans	7- 10 ans	10- 13 ans	13- 15 ans	>15ans	Grossesse (des 4 mois)	Allaitement
Homme	1	2	3	5	7	9	9.5	10		
Femme	1	2	3	5	7	7	7	7	10	11

Tableau 1:Apport recommandé en zinc en fonction du genre et de l'âge, en mg/jour

La rétention du zinc apporté par les aliments diffère pour l'homme et la femme. Alors que pour une alimentation à base de 400 g/j de riz blanc, la quantité de zinc retenu par l'organisme est de 2.69 mg/j pour les hommes et 1.86 mg/j pour les femmes, des quantités qui sont largement en dessous de la moitié des besoins (Bouis,2018). La biodisponibilité du zinc pour l'organisme peut être stimulée par d'autres types d'aliments ou inhibée par la présence d'autres micronutriments ou nutriments ayant des effets antagonistes (Tableau 2).

Facteurs	Eléments
Inhibiteurs	Phytate (Acide phytique), phosphate
	Fibres alimentaires telles que cellulose,
	hémicellulose, lignine
	Caséine
	Hautes doses de fer, cuivre et calcium
Stimulants	Protéines animales
	Formateurs de complexes tels qu'acides
	aminés (histidine, cystéine)
	Acides organiques (citrate)
	Peptides

m 11	0.11	· /1	. 1	/	1 •
Tablean	2. Facteurs	influen	cant la	resorption	dii zinc
I ubicuu	a.r uotouro	muudu	guine nu	recorption	au biile

Dans les grains de riz, le Zn peut être lié à l'acide phytique (InsP6), qui sert de réservoir majeur de phosphore (P) dans les plantes et les graines (Raboy 2001, 2009). L'acide phytique est indigeste pour les animaux monogastriques, y compris les humains, et par conséquent, le Zn lié avec l'acide phytique sont à peine absorbés par les humains (Raboy 2001). Il a été démontré qu'une grande quantité de P est colocalisé avec le Zn dans les couches d'aleurone et sous-aleurone (Johnson et al. 2011).

Pour une population dont la base alimentaire est le riz comme les malagasys, la carence journalière en Zinc est inévitable.

I-5Les effets de la carence en zinc

La carence en Zinc chez les enfants se manifeste par le retard de croissance ; le retard du développement intellectuel due à des disfonctionnements neurologiques ; la vulnérabilité aux diarrhées et à la pneumonie, maladies infectieuses et anémie (Roohani et al. 2013 ; Galetti, 2018). Chez les femmes enceintes, la mortalité infantile peut survenir en cas critique de manque de zinc (Prasad, 2009 ; Graham et al., 2012). La lenteur de la cicatrisation de plaies et la dégradation des défenses immunitaires sont les résultats d'une carence en zinc (Lansdown,2007) ainsi que l'immaturité des testicules (Prasad, 2003 ; Imoberdorf, 2010). Deux milliards de personnes du Tiers-Monde sont concernées par une carence en zinc, aussi en raison de la dysfonction immunitaire qu'elle provoque, ces populations sont particulièrement susceptibles aux maladies infectieuses et parasitaires (Imoberdorf, 2010). A Madagascar, environ 80% de la population malagasy souffrent de carence en Zinc (Shiratori et al, 2018).

La situation nutritionnelle des enfants à Madagascar est très précaire et structurellement fragile : 53 % des enfants de moins de 5 ans présentent un retard de croissance, 42 % des enfants souffrent d'insuffisance pondérale, 13 % souffrent de malnutrition aiguë (WFP 2016).

Madagascar présente le cinquième taux de malnutrition chronique le plus élevé dans le monde. C'est la conséquence des carences nutritionnelles chroniques au cours des 1000 premiers jours de la vie d'un enfant, de la conception, la grossesse, jusqu'à l'âge de deux ans. Les dommages causés par les manques d'apport en Zinc durant ces premières années au développement est irréversible.

La malnutrition chronique rend un enfant chétif et donc plus vulnérable aux maladies. Un enfant qui a un retard de croissance est cinq fois plus susceptibles de mourir de diarrhée qu'un enfant normal. Et, le plus important : un enfant qui a un retard de croissance n'atteindra jamais sa pleine capacité cognitive et ne sera jamais capable d'apprendre autant ni de gagner autant qu'un enfant normal tout au long de sa vie (WFP,2017). En effet, les déficits associés au retard de croissance dans le développement du cerveau se traduire par une perte de deux à trois années d'apprentissage.

Plus tard dans la vie, lorsque les enfants souffrant d'un retard de croissance entrent sur le marché du travail, leur développement physique et cognitif diminué peut réduire leur capacité de gain jusqu'à 22 %. Les pertes en ressources humaines ainsi que les couts économiques y afférents sont colossale soit pour Madagascar \$6.4 millions de pertes due aux conséquences des déficiences en Zn avec un cout de soins de \$16.2 millions. Alors que les pertes futures estimées engendrées par les retards de croissance de 53% des enfants malagasy est de \$268.3 millions (Banque mondiale, 2015). La malnutrition chronique est un fléau dévastateur mais tout à fait évitable.

I-6Apports et interventions faites pour pallier la carence en zinc

I-6-1 Apport directe de zinc

Les poudres de Multi-Micronutriments (MMP) composées de seize (16) vitamines et minéraux à « saupoudrer » sur les plats ont été préconisées et distribuées par l'UNICEF à Madagascar (UNICEF,2018). Les MMP ont démontré des résultats impressionnants pour la réduction des carences d'une gamme de micronutriments. Des essais contrôlés et des examens sur des échantillons d'enfants ont montrés que l'apport des MMP ont amélioré le développement cognitif des enfants mais aussi la réduction de la carence en zinc s'est remarquée avec une diminution de 13% de l'incidence de la diarrhée et de 19% de pneumonie (Yakoob, 2011). Cependant, les couts liés aux préparations, importation et distributions des MMP sont très élevés réduisant les zones d'intervention et même réduisant les doses administrées.

La fourniture de suppléments en zinc dans le cadre du traitement de la diarrhée a réduit le taux de mortalité de 46% et a restreint le nombre d'hospitalisations liées à la diarrhée à 23 % (Salam, 2011). D'après une enquête nationale 44,5 % des enfants souffrant de diarrhée sont traités au CSB ou dans un autre centre de santé (ENSOMD, 2012). Cependant, l'UNFPA a rapporté un très faible niveau de sensibilisation et d'utilisation du zinc chez les mères et le personnel de santé (ENSOMD,2012).

I-6-2 Fortification des aliments de bases

Le riz fortifié est généralement consommé sous forme de grains blanchis, plutôt qu'en farine, et sa fortification nécessite la création de nouveaux grains fortifiés. En conséquence, le coût de l'opération serait sept fois plus élevé que pour la fortification usuelle de la farine. Aujourd'hui, les fabricants de grains fortifiés tournent à faible régime, leur production étant destinée à de petites quantités de riz utilisées dans des projets pilotes et des programmes de distribution alimentaire ciblés (WFP, 2016).

Les bénéficiaires de ces riz fortifiés dans le Sud de Madagascar sont réticents du fait de la forme reconditionnée du produit qu'ils croient être du riz Plastique.

I-6-3 Les interventions agronomiques :

L'agriculture joue un rôle très important dans l'amélioration de la sécurité alimentaire tant du point de vue quantité que qualité. Une des stratégies proposées pour réduire la malnutrition est la biofortification agronomique qui est une stratégie agricole visant à augmenter la teneur en micronutriments dans les cultures vivrières de base telles que le maïs, le millet perlé, le riz, le blé et autres (HarvestPlus, 2012).

La biofortification agronomique fait intervenir l'apport d'engrais riche en zinc ainsi que l'optimisation de différentes techniques agricoles en vue d'augmenter la biodisponibilité et l'absorption du zinc dans le sol par la plante. (Cakmak et Kutman, 2018). Une des approches la plus recommandée est l'application de Zn par le biais d'engrais ou de pulvérisations foliaires (Boonchuay et al., 2013; Doolette et al., 2018; Wang et al., 2020a; Yu et al., 2021). La plupart des études faites sur les engrais riches en zinc avaient pour objectif au début d'augmenter le rendement des cultures, cependant l'application de Zn est devenue de plus en plus courante dans régions céréalières des pays arides, comme la Turquie et Australie, avec une amélioration réussie du zinc dans le grain. (Cakmak, 2002; Cakmak et al., 2010a ; Boonchuay et al., 2013). En Chine, la fertilisation du Zn des sols ou une application foliaire ont été proposées pour atteindre la cible de 40 mg Zn kg⁻¹ dans les grains de blé (Huang et al., 2019 ; Yu et al., 2021). Cependant, les engrais peuvent être coûteux et inaccessibles. La plupart des producteurs Malagasy ne peuvent pas payer les engrais nécessaires pour leurs cultures. D'autant plus que les engrais riches en zinc ne sont pas populaires voire inaccessible sur le marché malagasy. L'utilisation d'engrais a aussi des limites lorsque la potentialité des espèces cultivées ou cultivar est atteint, l'apport d'engrais sera considéré comme une consommation de luxe pour la plante (Cakmak et Kutman, 2018). L'amorçage nutritif des graines (Zn-dipping), un processus où les graines sont trempées dans une solution nutritive aqueuse, a été utilisé pour améliorer le rendement, et il a également été démontré qu'il augmente la teneur en Zn des grains du blé (Reis

et al., 2018). Cependant, cette approche peut facilement causer la phytotoxicité et exige des ressources considérables de la part des agriculteurs en termes de coûts et temps.

I-6-4 Origine du Zinc dans le sol

Le zinc en tant que microéléments est présent dans tous les types de sols mais leur concentration varient considérablement en fonction de différents facteurs relatives aux sols et aux activités anthropiques.

La roche mère est le premier déterminant de la concentration de zinc dans le sol (Wissuwa, 2008). En effet, la teneur totale en zinc d'un sol dépend largement de la composition géochimique de la roche mère altérée sur laquelle le sol s'est développé. La teneur moyenne en zinc des roches de la croûte terrestre est de 78 mg Zn kg⁻¹. La teneur en zinc la plus élevée est attribuée aux roches basiques ; telles que les basaltes ou le zinc (Zn²⁺) substitue de manière isomorphe le Fe²⁺ ou Mg²⁺ qui sont les principaux composants de ces roches. Cependant, les roches plus riches en silice, telles que les granites et les roches métamorphiques, y compris les gneiss, ont des teneurs totales en zinc beaucoup plus faibles car leur produit d'altération résiduel est généralement du sable de quartz qui donne lieu soit à des sols sablonneux, soit à des sédiments sablonneux qui subissent une diagenèse et forment des roches sédimentaires gréseuses avec de faibles concentrations de zinc et d'autres micronutriments essentiels.

La teneur en zinc dans le sol dépend de la teneur en argile et en sable du sol (Gorny, A et al., 2009). Les sols argileux sont riches en zinc. Ceci est une conséquence à la fois des concentrations plus élevées de zinc dans les matériaux parentaux d'argile et de schiste et aussi de la plus grande capacité des sols riches en argile à adsorber et à retenir le zinc et d'autres éléments par rapport aux sols avec des pourcentages plus faibles d'argile et des pourcentages plus élevés de sable. Les gleysols sont des sols qui sont soit en permanence, soit temporairement humides (gorgés d'eau) avec des conditions réductrices en profondeur. Les sols qui sont réduits en permanence ont généralement des couleurs grises ou bleu-vert, mais les sols qui présentent des conditions alternativement réductrices et oxydantes peuvent avoir des couleurs bruns rougeâtres lorsqu'ils s'assèchent et sont oxydés. Ces sols sont les plus touchées par la carence en zinc due au potentiel d'oxydo-reduction (Krauskopf, K.B., 1967)

Les conditions fortement réductrices augmentent le PH du sol ainsi que la concentration en ions bicarbonate et parfois la concentration en ions magnésium. Elle provoque aussi la formation de

sulfure de zinc insoluble (ZnS). Les sols périodiquement gorgés d'eau donnent également lieu à des concentrations accrues d'ions divalents ferreux (Fe²⁺) et de manganèse (Mn²⁺), qui peuvent concurrencer l'absorption du ZN²⁺ par les racines des plantes.

Les fertilisants utilisés en agriculture peuvent contenir du zinc absorbable par les plantes. En effet, tous les fumiers contiennent du zinc provenant du régime alimentaire initial des animaux (par exemple, herbe, foin, céréales, etc.), mais des quantités supplémentaires de zinc peuvent avoir été ajoutées intentionnellement aux régimes alimentaires du bétail. Dans les régions où l'élevage est intensif, le zinc (ainsi que le cuivre) est souvent donné aux animaux pour des raisons de santé et de bien-être, ou comme stimulateur de croissance.

Le superphosphate est l'engrais qui s'est avéré contenir les plus fortes concentrations de zinc (< 600 mg Zn kg⁻¹), mais son utilisation est en déclin en raison de son remplacement par des composés plus purs tels que le phosphate monoammonique (MAP) et le phosphate diammonique (DAP) (Brennan, R.F. 2001).

Les déchets ménagers et industriels peuvent contenir du zinc cependant la quantité varie considérablement en fonction de chaque ménage et de chaque industrie. D'autant plus que les effets sur le sol sont très localisés (Gray, C.W,2003)

I-6-5 Les formes de Zinc dans le sol

Selon Kiekens, L (1995) la quantité totale de zinc dans les sols est répartie sur 5 fractions (ou pools). Celles-ci comprennent :

i) Le pool hydrosoluble : présent dans la solution du sol,

ii) Le pool échangeable : ions liés aux particules du sol par des charges électriques,

iii) Le pool lié aux organiques : ions adsorbés, chélatés ou complexés avec des ligands organiques,

iv) Réservoir de zinc adsorbé de manière non échangeable sur des minéraux argileux et des oxydes métalliques insolubles,

v) Réserve de minéraux primaires d'altération,

Zn²⁺ et ZnOH⁺ sont les formes de zinc libres disponibles dans la solution du sol. La solubilité du zinc dans le sol dépend spécifiquement du pH du sol.

 $Zn(OH)_2 \text{ (amorphe)} > Zn(OH)_2 > Zn(OH)_2 > Zn(OH)_2 > Zn(OH)_2 > ZnCO_3 \text{ (smithsonite)} > ZnO (zincite) > Zn (PO4)_2.4H_2O) \text{ (willemite)} > Zn du sol > Zn Fe_2O_4 \text{ (franklinite)}.$

Le pH du sol régit la forme du zinc en solution. À des valeurs de pH inférieures à 7,7, Zn^{2+} prédomine, mais au-dessus de pH 7,7, ZnOH⁺ est la forme principale, et au-dessus de pH 9,11, la forme neutre Zn(OH)₂ est dominante. Le zinc forme des complexes solubles avec les ions chlorure, phosphate, nitrate et sulfate, mais les espèces neutres sulfate (ZnSO₄) et phosphate (ZnHPO₄) sont les plus importantes et contribuent à la concentration totale de zinc en solution.

Barrow, N.J. (1993) a rapporté des travaux qui ont montré que les ligands organiques réduisaient les quantités de zinc adsorbées sur un sol d'oxisol et que l'effet était plus prononcé avec les ligands, y compris les acides humiques, qui complexaient le zinc le plus fortement. Les formes solubles du zinc complexé par des composés organiques peuvent rendre le zinc de plus en plus mobile et disponible pour les plantes dans les sols. Dans de nombreux cas, la complexation du zinc organique avec des ligands organiques entraîne une diminution de l'adsorption sur les surfaces minérales (Harter, R.d.,1991). Kiekens et Cammerlynck (1992) ont montré que le zinc dans les sols était réparti de manière égale entre les formes complexées organiquement et les formes inorganiques ou Zn2+ en solution.

La capacité d'absorption de Zn par la plante se fait à travers la rhizosphère par acidification et sécrétion de composés solubilisant Zn et chélateurs composés principalement des acides organiques, tels que le malate, le citrate et l'oxalate et surtout des phytosidérophores, tels que l'acide désoxymuginique (DMA) dans les plantes monocotylédones (Cakmak et al., 1996; Von Wiren et al., 1996 ; Gupta et al., 2016). Un mécanisme similaire est également impliqué dans la détoxification du Zn dans la rhizosphère en cas de toxicité en zinc du sol. (Tsednee et al., 2014).

I-7 La Biofortification liée à l'amélioration variétale

Des efforts concernant la biofortification ont été entrepris depuis 2003 par différents chercheurs du CGIAR pour pallier la faim cachée par l'amélioration des concentrations en zinc dans les parties consommables des aliments de base dans les pays en voie de développement. Les études ont été axées sur le développement de nouvelles variétés des sept cultures de base (manioc, maïs, patate douce, haricots, perle millet, riz et blé) qui contiennent des niveaux significativement critiques de micronutriments biodisponibles (HarvestPlus,2013). L'accent a été mis sur la vitamine A, le fer et le zinc, qui sont à part l'iode qui peut être assez facilement traité par le l'iodation du sel de table, reconnue par la communauté internationale de la nutrition comme étant la plus limitante dans les régimes (Black et al. 2013). Des interventions d'améliorations des plantes ont été entreprises pour adapter et multiplier des nouvelles variétés et les livrer aux ménages ruraux en Asie (Bangladesh, Inde et Pakistan), Afrique (Mozambique, Nigéria, Rwanda, Ouganda et Zambie), et Amérique latine et Caraïbes (Bolivie, Brésil, Colombie, Haïti, Honduras, Guatemala, Nicaragua et Panama).

Dans le cadre de cette étude, le riz a été l'objet des recherches effectuées.

Pour le riz un rang mondial a été établi par HarvestPlus pour déterminer la place de chaque pays en termes de priorisation de biofortification en utilisant le BPI (Indice de Priorisation en Biofortification).

Madagascar a un BPI très élevé pour le riz et se classe 3^{ème} en Afrique et 13^{ème} dans le monde (**Figure 1**).



Figure 1:Classement mondial de la priorisation de la biofortification en riz

Identifier les déterminants responsables de la variation de la teneur en zinc entres les variétés de riz fourniraient des outils précieux pour la sélection et la réussite de la biofortification. Cela implique de savoir les mécanismes physiologiques qui permettent à la plante d'absorber, de transporter et de transférer le zinc dans chaque partie de la plante.

I-7-1 Mécanisme d'absorption de zinc par la plante.

Le Zn est un élément essentiel pour les plantes, servant de cofacteur à de nombreuses enzymes (Marschner 1995). Le Zn est absorbé de la rhizosphère par le riz sous la forme à la fois Ion Zn² $^+$ et complexes Zn-DMA. Plusieurs transporteurs ZIP (zinc iron regulated-like transporter) jouent un rôle dans l'absorption des ions Fer. Ramesh et al (2003) accentuent aussi le rôle de certains de ces ZIPs transporteurs dans l'absorption de Zn²⁺.OsZIP1 (Oryza sativa ZIP), OsZIP5, OsZIP8 sont exprimés dans l'exoderme racinaire et leurs présences sont positivement corrélées avec la carence en Zn dans le sol (Lee et al. 2010a, Yang et al. 2009 ; Lee et al. 2010b) OsIRT1 (Iron Regulatoer Transporter), qui est principalement un transporteur impliqué dans l'acquisition de Fe²⁺ par le riz, est susceptible d'absorber également Zn (Lee et An, 2009).

Selon les études faites par (Arnold et al. 2010) dans des conditions d'abondance de zinc dans le sol, la sécrétion racinaire diffère selon les génotypes. L'absorption du complexe Zn-DMA stimulé par les secrétions racinaires peuvent être un élément clé sur la différence de performance des génotypes. Cependant, la plante priorise l'absorption de Zn^{2+} qui est la forme principale de Zn (Suzuki et al. 2008).

I-7-2 Transport de zinc intra-racinaire.

Une fois que les nutriments sont absorbés à la surface des racines, ils doivent être transportés radialement à travers différentes couches de tissus racinaires pour atteindre la stèle racinaire, puis le système vasculaire.

Anatomiquement, les racines de riz ont deux bandes caspariennes (externe à l'exoderme et interne à l'endoderme), couches de cellules contenant de la subérine qui bloquent le flux apoplastique radial des nutriments et de l'eau dans les racines (Sasaki et al. 2016; Che et al. 2018). Par ailleurs, dans les racines de riz, l'aérenchyme (entre l'exoderme et l'endoderme) est impliqué dans les échanges gazeux dans les conditions irriguées des rizières (Kawai et al. 1998). Les éléments minéraux absorbés par les cellules de l'exoderme de la racine de riz vont être

libérés dans l'aérenchyme pour être transporté par voie apoplastique vers l'endoderme, puis doit être à nouveau transporté dans le symplaste par les cellules de l'endoderme pour finalement atteindre la stèle racinaire (Sasakiet coll. 2016 ; Che et al. 2018). Cette structure racinaire unique au riZnécessite une paire de transporteurs, c'est-à-dire un transporteur d'efflux à l'exoderme et un transporteur d'influx à l'endoderme, pour un transfert efficace de nutriments des racines vers d'autres parties de la plante (Sasaki et al. 2016). Cependant, on ne sait que peu sur Transporteurs Zn impliqués dans ce transport intra-racinaire.

I-7-3 Translocation du zinc du système vasculaire et allocation aux différents organes

Les transports du Zn des cellules du péricycle de la stèle racinaire sont connus pour être médiées par HEAVY METAL ATPASE 2 (OsHMA2) (Yamaji et al. 2013, Takahashi et al. 2012, Satoh-Nagasawa et al. 2012). OsHMA9, codant pour un transporteur d'efflux de Zn localisé sur membrane plasmique, est à son tour exprimée principalement dans la stèle et moins dans les autres parties de la racine de riz (Lee et al. 2007). Par conséquent, OsHMA9 joue un rôle dans le chargement de Zn sur le xylème. Alors que OsZIP4 est un transporteur impliqué dans le transport du Zn du phloème car son expression est induite dans les cellules du phloème des racines sous condition de carence en Zn (Ishimaru et al. 2005).

Chez les plantes graminées, les nœuds jouent un rôle important en tant que plaque tournante pour fournir le Zn à différents organes aériens (Yamaji et Ma 2014). Après avoir été absorbé par les racines, le Zn est principalement chargé dans le xylème et suit son flux par transpiration pour atteindre les parties aériennes de la plante. Toutefois, si une faible transpiration survient, les parties supérieures de la plante qui ont besoins du Zn pour leurs fonctions physiologiques vont être en état de déficience. De ce fait, les nœuds sont présents pour jouer le rôle des accumulateurs et des distributeurs de zinc dans tous les organes des différents niveaux de la plante. Chez le riz, ce transfert intervasculaire de Zn aux nœuds est médiée par les transporteurs de Zn OsZIP3 et OsHMA2 (Yamaji et al. 2013 ; Yamaji et Ma 2014 ; Sasaki et al. 2015). En raison d'une distribution préférentielle de Zn aux jeunes tissus, les tissus du méristème des pousses de riz ont une concentration en Zn plus de 10 fois supérieure à celle des tissus dans les feuilles matures photosynthétiquement actives (Kitagishi et Obata 1986).

Les transporteurs impliqués dans le transport de Zn dans le phloème n'ont pas été signalés à ce jour. Cependant, l'efflux de Zn des feuilles matures pourrait être médié par OsHMA9 (Lee et
al. 2007). Anatomiquement, les tissus du grain de riz, y compris l'endosperme et l'embryon, sont isolés du tissus de la plante mère (Krishnan et Dayanandan 2003; Palmgren et al. 2008). Par conséquent, le transport des nutriments dans les grains de riz en développement nécessite une paire de transporteurs : un transporteur d'efflux sur le côté tissu maternel et un transporteur d'influx côté graine. Les études concernant le mécanisme moléculaire de transport et de transfert de nutriment dans les grains sont très peu surtout pour le Zinc.

I-7-4 Forme du zinc durant les transports à long distance :

Nicotianamine ou NA est un chélateur de métaux universellement présent dans le règne végétal et est essentiel pour le transport des métaux dans les plantes (Takahashi et al. 2003). C'est aussi le précurseur du DMA chez les graminées.

La forme de Zinc transportée par le Xylème n'est pas encore précise à ce jour. On considère que, chez les plantes y compris le riz, Zn dans du xylème existe à la fois sous forme d'ions libres et sous une forme liée à certains chélateurs (Marschner 1995; Yoneyama et al. 2015). Des chercheurs ont émis l'hypothèse de la liaison du Zinc avec le NA dans le Xylem sous le pH de 5,5, qui est un pH typique du xylème (Rellán-Álvarez et al. 2008, Inoue et coll. 2003, Suzuki et al. 2008). La forme chimique du Zn dans le phloème du riZn'est pas claire non plus, en particulier en ce qui concerne les chélateurs (NA ou DMA) prédominants. Les resultats divergent : Suzuki et al (2008) ont montré que le complexe Zn-DMA sert de transport de Zn durant la translocation du Zn dans les plants de riz en condition de déficience en zinc dans le sol. Alors que, l'analyse ESI-TOF de la sève du phloème du riz montre que NA est le seul chélateur du Zn dans la sève du phloème du riz (Nishiyama et al. 2012).

I-7-5 Genès associés à la biofortification en Zn du riz

L'absorption, le transport et l'accumulation de zinc dans le grain de riz sont régis par des loci de caractères quantitatifs (QTL) et de gènes complexe. Plusieurs QTL avec une variance phénotypique modérée à une variance élevée issue des populations biparentales et multiparentales ont été rapportés pour la concentration de Zn dans les grains sur les 12 chromosomes du riz (**Tableau 3**).

La cartographie des gènes à effet majeur (QTL) pour la concentration en zinc et la compréhension de leur base moléculaire peut accélérer le développement du riz biofortifié en

Zn grâce à la Sélection Moléculaire assistée par Marqueurs (MAS). Ces portions de gènes après identification peuvent être transfères dans les variétés cibles. La plupart des régions génomiques identifiées contenant les importants QTL associés aux zincs dans les plantes se réfèrent aux multiples gènes hypothétiques et fonctionnellement annotés qui fonctionnent comme des chélateurs de métaux et des transporteurs d'ions (Swamy et coll. 2016).

QTL	LOD/p value	PVE	Effet additif (mg/	Reference
		(%)	kg)	
qZn1.1, qZn2.1, qZn3.1,	2.5–12.4	3.0-	0.21–6.60	Swamy et al.
qZn3.2, qZn5.1, qZn6.1,		36.0		(2018a)
qZn8.1, qZn8.2, qZn9.1,		2010		(20104)
qZn10.1, qZn12.1				
qZn2.1, qZn2.2, qZn3.1,	4.3–10.3	7.5–	0.9–2.1	Swamy et al.
qZn6.1, qZn6.2, qZn8.1,		22.8		(2018b)
qZn11.1, qZn12.1, qZn12.2				
qZn1.1, qZn2.1, qZn4.1,	0.001-0.0001	9.2–	-	Descalsota et al.
qZn6.1, qZn6.2, qZn7.1,		13.75		(2018)
qZn12.1				
qZn1.1, qZn6.1, qZn12.1,	0.0000905-	11.9–	-	Descalsota-
qZn12.2, qZn12.3	0.00029	17.9		Empleo et al.
				(2019a)
qZn2.1, qZn3.1, qZn5.1,	2.77-8.99	8.6–	0.81–2.06	Descalsota-
qZn5.2, qZn7.1, qZn8.1,		27.7		Empleo et al.
Zn9.1, qZn11.1				(2019b)
qZn1.1, qZn6.1, qZn6.2	2.6–3.9	2.9–	0.06–3.2	Dixit et al.
		34.2		(2019)
qZn1, qZn5, qZn7	-	17.57–	-	Zaw et al.
		20.0		(2019)
qZn1.1, qZn5.1, qZn9.1,	3.14–5.2	8.96–	0.77–0.96	Calayugan et al.
qZn12.1		15.26		(2020)
Zn1.1, qZn1.2, qZn1.3,	3.28–15.36	12.60-	2.62-4.73	Jeong et al.
Zn2.1, qZn4.1, qZn5.1,		46.80		(2020)
Zn6.1, qZn7.1, qZn9.1,				

Tableau 3:Liste des QTLs responsables de la concentration en zinc dans le riz.

Zn10.1, qZn11.1, qZn11.2, Zn11.3, qZn12.1				
qZn3.1, qZn3.1, qZn4.2	4.11–9.16	9.89– 24.56	0.0001–0.1	Lee et al. (2020)

QTL: quantitative Trait Loci (qZnx.y avec x et y numéro et position du locus dans le chromosome), PEV: Phenotypique Variance Explained, LOD:Logarithm of the odds, indiquant la probabilité que 2 loci soient situés a proximité l'un de l'autre sur un chromosome et sont donc susceptible d'etre hérités ensemble.

La cartographie QTL est couramment utilisée pour les études moléculaires de traits complexes. Cependant cette approche implique différents croisements pour pouvoir exploiter la multiplicité génétique et pour augmenter les gains génétiques en zinc dans les populations biparentales. L'amélioration, l'exploitation de marqueurs moléculaires ainsi que des cartes de liaison utilisées dans ces approches aident à découvrir les caractères d'intérêt dans le génome du riz (Collard et Mackill 2008). Cependant, cette méthode a un pouvoir limité pour détecter les loci à effets mineurs (Bernardo 2008 ; Collard et Mackill 2008 ; Ben-Ari et Lavi 2012). Pour le cas de Madagascar, le programme de sélection et d'amélioration des plantes pour le caractère concentration en Zn dans les grains est encore à ses débuts. Aucun donneur n'a pas encore été détecte en vue d'améliorer la concentration en zinc des riz consommés.

Les Mononucléotides polymorphismes (SNP) à haut débit destiné au génotypage ont été récemment utilisées pour le des études de liaison des génomes ou GWAS en vue de l'identification des loci associées au zinc dans les grains (Descalsota-Empleo et al, 2018 ; Wang, 2020). Aussi, une méthode, autre que le QTL mapping et le GWAS, basée sur la computation des données nommée la sélection génomique (GS) prend en compte les effets à l'échelle du génome comprenant les effets majeurs et mineur des loci. Le GS peut être un outil d'évaluation des valeurs génétiques estimées (GEBV) des lignées généalogiques (Meuwissen et al. 2001) et des accessions issues des banques de gènes (Ryokei et al, 2019). Avec les progrès récents des statistiques, les modèles d'apprentissage automatique (cross-validation) sont utilisés pour estimer avec précision les GEBV (Montesinos-López et al. 2019). De plus, cette méthode accélère les cycles de sélection, ce qui améliore le gain génétique annuel et réduit considérablement les coûts (Shamshad et Sharma 2018). La Sélection génomique peut être un

outil très effectif pour la sélection de donneur en vue d'améliorer la concentration en zinc dans les grains de riz. Ces études d'association à l'échelle du génome (GWAS) et l'approche des sélections génomiques (GS) n'ont pas été beaucoup explorés pour améliorer les micronutriments du grain de riz, malgré le fait qu'ils sont très prometteurs. En effet, du fait de la nature complexe d'un caractère comme la concentration en Zn du grain, qui dépend de multiples mécanismes physiologiques, chacun potentiellement contrôlé par plusieurs gènes sous-jacents, une approche de sélection à l'échelle du génome est plus efficace que celle faite à partir d'un seul marqueur.

PARTIE 2: Genomic prediction of zinc-biofortifcation potential

in rice gene bank accessions*

* This chapter is adapted from:

Mbolatantely Rakotondramanana, Ryokei Tanaka, Juan Pariasca Tanaka, James Stangoulis, Cécile Grenier, Matthias Wissuwa.

Received: 24 November 2021 / Accepted: 19 April 2022 on Theoretical and Applied Genetics https://doi.org/10.1007/s00122-022-04110-2

II-1 Résumé

L'augmentation des concentrations de zinc (Zn) dans les parties comestibles des cultures vivrières, dit Zn-biofortifcation, est une des objectifs des sélectionneurs pour atténuer la malnutrition en micronutriments. En particulier, la carence en Zn est plus prononcée chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays comme Madagascar ou la source principale de nourriture est le riz. L'utilisation des variétés de riz biofortifiées avec une concentration élevée de Zn dans les grains offriraient une solution et notre objectif est d'explorer la variation génotypique présente chez les différentes accessions de riz de la banque de gènes. Identifier les facteurs génétiques sous-jacents grâce à la prédiction génomique et GWAS (Genome Wide association Study) en vue de détecter un ou plusieurs donneurs pour une programme de sélection et de création variétale à Madagascar est l'outil proposé. 253 accessions de riz issues de la banque de gène d'IRRI ont été cultivées sur deux sites à Madagascar pour déterminer les concentrations de Zn dans les grains ainsi que le rendement. L'analyse GWAS multi-locus a

identifié huit loci. Parmi ceux-ci, QTN_11.3 est le plus important avec un allèle rare qui augmente la concentration de Zn dans les grains de 15 %. Un modèle de prédiction génomique a été développé à partir des mêmes accessions que ci-dessus pour prédire les concentrations de Zn de 3000 accessions de riz séquencées de l'IRRI. Les concentrations prédites variaient de 17,1 à 40,2 ppm avec une précision de prédiction de 0,51 qui est satisfaisant comparée aux autres études sur le maïs et le riz pluvial (r=0.50). Une confirmation indépendante avec 61 échantillons venant de la banque de gènes de l'IRRI a fourni des corrélations élevées (r = 0,74) entre les valeurs mesurées et prédites. Les accessions de la sous-espèce AUS avaient les concentrations de Zn dans les grains les plus élevées issues de la prédiction et celles-ci ont été confirmées dans des expériences de terrain supplémentaires, avec un potentiel donneur ayant plus de deux fois plus de Zn dans le grain par rapport à une variété témoin locale X265. Nous avons conclu que le sous espèces AUS pouvaient être de très bons donneurs en termes de Zinc. Un donneur du groupement AUS a été sélectionné dans ce but « CHANDART ». Aussi l'utilisation de la sélection génomique pendant le processus de sélection est l'approche la plus prometteuse pour augmenter la concentration de zinc dans les grains de riz

II-2 Introduction

Zinc (Zn) is an essential element for plants and humans alike, because Zn is a component of thousands of enzymes and a key regulator of gene expression and protein synthesis (Broadley et al. 2007; Galetti 2018). Zinc malnutrition is a global health problem that is particularly serious in infants where it impairs immune system function and delays infant development, causing stunting as the most visible symptom (Roohani et al. 2013; Galetti 2018). Alleviating human malnutrition for Zn has been included as one of the top priorities in the Sustainable Development Goals (SDG 2.2: End all forms of malnutrition). In 2003 the Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR) initiated a program to breed crops with higher concentrations of Zn, Fe and Pro-vitamin A carotenoids in the edible parts of a crop, an approach termed biofortification (Bouis and Saltzman 2017). Biofortification of crops represents an alternative to food fortification and while both approaches are important in alleviating malnutrition, it is believed that crop biofortification is a very efficient tool to reach rural communities that are largely food self-sufficient (Virk et al. 2021). Programs to develop Zn biofortifed rice varieties have been successful in Asia (Swamy et al. 2016; Rao et al. 2020) and Latin America (Harvest Plus 2021) but concerted efforts to do so in Africa are still non-existing.

Madagascar remains a low-income country with a high level of malnutrition (The World Bank 2016; WFP 2010). In rural areas, 50% of children suffer from stunting and are underweight (Stewart et al. 2020), one of the highest rates in the world (UNICEF 2019). In the central highlands, the highest levels of stunting (60%) are found and recent surveys by JIRCAS and partners estimated that 80% of the population consume inadequate amounts of Zn (Shiratori et al. 2018). Rice is essential in Malagasy diets; it is eaten three times a day and represents 50 percent of the daily caloric intake with per capita consumption being above 120 kg annually. Rice, having such a pre-eminent position for food supply, is naturally a target for intervention. Consequently, Madagascar has the 3rd highest Biofortification Prioritization Index (BPI) for Zn in rice for Africa and the 13th highest globally (Harvest Plus 2021). Zn concentrations in polished rice are typically too low to supply a sufficiently high proportion of the daily required intake of Zn (Bouis and Welch 2010), thus where rice is the main staple and households cannot afford to diversify their meal by adding mineral-rich fruits, vegetables and meat, Zn deficiency is prevalent (Harvest Plus 2021). To overcome this deficiency, grain Zn concentration in rice needs to be increased by 50% or more to significantly alleviate Zn malnutrition (Bouis and Welch 2010). Developing rice varieties with increased grain Zn concentrations therefore remains an important global objective (Rao et al. 2020) that offers a low-cost and long-lasting solution to the persisting problem of Zn malnutrition (Bouis et al. 2011).

Rice grain Zn concentrations are strongly affected by factors such as genotype and environment, with soil properties being the main source of environmental variation. For a given genotype, grain Zn concentrations may vary by a factor 2–3 depending on soil type and related Zn bio-availability for plant uptake (Wissuwa et al. 2008; Goloran et al. 2019; Rao et al. 2020). Low Zn bio-availability in paddy soils is commonly associated with alkalinity (high soil pH and excess bicarbonate) and very low soil redox potentials (Johnson-Beebout et al. 2016). Both factors trigger the formation of Zn-complexes with soil constituents and in consequence the soluble Zn fraction that is removed by the plant will be replenished too slowly to assure high Zn uptake rates (Broadley et al. 2007). The effect of a decreasing soil redox potential after flooding tends to cause Zn bio-availability to be lowest toward the end of the cropping season and thus reduces Zn uptake during the reproductive phase when Zn taken up may be directly transported to reproductive organs. For this reason, basal Zn fertilizer application has often very limited effects on increasing grain Zn concentrations (Johnson-Beebout et al. 2016) and it

would explain the observation that grain Zn concentrations tend to be lower during the rainy season compared to the dry season (Goloran et al. 2019).

The genotypic variation in grain Zn concentrations is similar in magnitude to the environmental variation with 2–3-fold differences having been detected repeatedly (Norton et al. 2014; Swamy et al. 2018; Zhang et al. 2018). Since grain Zn concentrations are influenced at many levels, starting with Zn uptake by the root, followed by transport and reallocation of Zn within the plant, to Zn loading into the grain (Swamy et al. 2016), it is likely the genotypic differences at each of these levels exist. Which of these factors contribute most to genotypic differences in grain Zn concentrations remains uncertain. Some high-Zn genotypes appear to rely mostly on Zn remobilization, whereas others maintain high Zn uptake rates during grain filling (Johnson-Beebout et al. 2016). At the same time, increased root uptake does not necessarily result in enhanced Zn accumulation in rice grains, suggesting Zn loading into the endosperm to be the main limiting step for which genotypic differences fortunately exist (Jiang et al. 2008).

Nicotianamine (NA) is a ubiquitous chelator of metal cations, such as Fe^{2+} and Zn^{2+} . Biosynthetic precursor of phytosiderophore secretion from roots, NA is responsible for Fe internal metal transport and maintenance of metal homeostasis. In rice, three NA synthase genes were identifed (OsNAS1, OsNAS2 and OsNAS3) that have been largely

studied to demonstrate their role in increased bioavailable Fe levels in rice grains (Higuchi et al. 2001; Inoue et al. 2003). Through transgenic approaches overexpressing the OsNAS gene, it has been possible to signifcantly increase both grain Fe and Zn concentration, indicating Zn transport processes to be of additional importance (Johnson et al. 2011). The genetic control of grain Zn concentration in rice has been widely studied, using bi-parental mapping populations (reviewed in Swamy et al. 2016), diversity panels (Norton et al. 2014; Zhang et al. 2018) or double-haploid (DH) derived biparental populations (Swamy et al. 2018). Consistently, these studies reported a large number of genetic regions controlling Zn concentrations are likely the result of multiple interacting physiological processes. For Zn uptake alone, it has been shown that at least two distinct processes, root proliferation and rhizosphere Zn mobilization, are causative of genotypic differences in plant Zn uptake (Mori et al. 2016). While none of the identified loci appear to be currently used in markerassisted breeding, loci on chromosomes 7,

11 and 12 have been identified consistently (Swamy et al. 2016). Of these, the QTL on chromosome 7 co-localizes with OsNAS3 and may therefore be of particular interest (Cu et al. 2021). The complex nature of a trait like grain Zn concentration, which depends on multiple physiological mechanisms, each potentially controlled by multiple underlying genes, may necessitate a genome-wide rather than a single marker selection approach. Genomic Prediction (GP; Meuwissen et al. 2001) for mineral content has already proven efficient in maize and wheat where the predictive ability (PA) for grain Zn content was between 0.43 and 0.73 in maize (Mageto et al. 2020) and between 0.33 and 0.69 for wheat (Velu et al. 2016) depending on the population and environment chosen. A similar PA of 0.51 was achieved for grain Zn concentration improvements in a rice synthetic population managed through recurrent selection when multi-site data were considered for the calibration model (Baertschi et al. 2021). Given that environmental factors strongly affect grain Zn concentration, it is of interest to determine to what extent GP can be employed in target environments that are less homogenous compared to the well-managed trials conducted on research stations. While the polygenic nature of grain Zn may favor a GP approach, it is possible that main effect single loci are more stable across environments and therefore possess greater predictive power in less controlled environments. We have grown a set of 253 rice gene bank accessions sampled from the 3 K genome project (Mansueto et al. 2017) in two farmer's fields in Madagascar and determined the variation for grain Zn concentrations and grain yield. Using this dataset, the objectives of this study were to:(i) Conduct genome-wide association studies (GWAS) in an attempt to detect alleles associated with high grain Zn concentrations,

(ii) Develop a GP model for grain Zn concentrations based on above training set and employ this model to predict grain Zn concentrations among the 3000 sequenced rice accessions available at the IRRI gene bank,

(iii) Identify potential donors with high grain Zn concentrations and confirm their suitability through confirmatory experiments.

II-3 Materials and methods

II-3-1-Field phenotyping

Field experiments were conducted at two sites in the central highlands of Madagascar, Anjiro (elevation 950 m, 18°54′01.7 "S 47°58′12.4 "E) and Ankazomiriotra (1150 m, 19°40′07.9 "S

46°33'53.9 "E). The experiments were carried out in farmers' felds under flooded lowland conditions during the 2017-18 rainy season with sowing in November, transplanting in late November to December and harvests in April to May. Following the typical farmer's practice in the region, chemical fertilizer was not applied and neither did fields receive organic manure. At each site, 523 accessions selected from the set of 3 K sequenced accessions available at IRRI were grown with two replications in a randomized complete block design. Several sub-sets selected to represent extreme variation for grain yield, maturity or plant height existed within these 523 accessions, (Tanaka et al. 2021) and only those considered adapted to our field sites were used in the present study (see below). At both sites, accessions were transplanted in 2-row micro-plots of 2 m length with spacing of 20 cm between and within rows (22 single plant hills per plot). Heading date (HD) was recorded at 50% heading for each accession. During harvest, five representative plants per plot were cut, panicles were separated from straw, placed in paper bags to avoid contamination by soil or dust, and taken to the laboratory where they were airdried for a week before total panicle dry weight was determined. Grain yield (GY) was estimated from the panicle weight of these five plants, assuming a realized density of 22 hills per m2 and expressed in kg per ha. Straw weight (SWT) was determined on the same five harvested plants, first as fresh weight which was then adjusted for moisture content after ovendrying a subsample for 48 h at 70 °C.

II-3-2-Grain processing and grain Zn analysis

Grain Zn concentrations were determined for a subset of 253 accessions from the 523 grown at field sites. All accessions considered poorly adapted to experimental sites were omitted, which included accessions with very early or late maturity and all accessions with low GY or that had lodged and had been contaminated by soil. A focus on well-adapted accessions was meant to prevent the potential confounding effect of high grain Zn being the result of poor grain yield and very low harvest index. A random sub-sample of the harvested grain from ten panicles per plot was dehulled to obtain brown rice and these whole grain samples were sent to Flinders University, Australia for further analysis.For inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) analysis, 0.3 g of whole rice seed, which had been ovendried at 80 °C for 4 h to remove remaining moisture, was acid-digested in a closed tube as described in Wheal et al. (2011). Elemental concentrations of samples were measured

using ICP-MS (8900; Agilent, Santa Clara, CA) according to the method of Palmer et al. (2014). The grain Zn concentration is given in μ g g-1 on a dry weight basis. In each of 10 digestion batches, a blank and a certified reference material (CRM; NIST 1568b rice four) were added for quality assurance. Samples with Al present at>5 μ g g-1 were considered to have unacceptable levels of purported soil contamination (Yasmin et al. 2014), thus they were eliminated from the dataset.

II-3-3-Statistical analysis for phenotypic values

Given the experimental design, the following linear model was fitted for each trait:

$y_{ijk=m+g_i+s_{ij}+\alpha_j+\beta_{jk}+e_{ijk}}$

where, y_ijk is the phenotypic value (i.e., observed Zn concentration) of i-th genotype evaluated at the k-th block in j-th site, m is the grand mean, g_i is the genotypic value of i-th genotype, s_ij is the interaction effect between the i-th genotype and the j-th site, α_j is the effect of j-th site, β_j k is the effect of k-th block in the j-th site, and e_ijk is the residual. The interaction effects s_ij and the block effects β_j k were modeled as random effects, and the other model terms were modeled as fixed effects. This model was implemented in lmer function in the lme4 package. To test the statistical significance between two sites, site effect (α_j) for each trait was tested based on the type-III analysis of variance with Satterthwaite's method using the anova function in the lmerTest package. The estimated values (best linear unbiased estimates; BLUEs) of g_i were used in the subsequent association mapping and the genomic prediction analyses.

Heritability was calculated based on the same linear model but treating the genotypic values gi as random effects. Using the estimated variance components of the genotypic values (σ_g^2), genotype-by-site interaction effects (σ_S^2), and residuals (σ_e^2 , a broad-sense heritability (H²) was calculated as follows;

$$H^{2} = \frac{\sigma_{g}^{2}}{\sigma_{g}^{2} + \frac{\sigma_{s}^{2}}{n_{\text{site}}} + \frac{\sigma_{e}^{2}}{n_{\text{block}} \times n_{\text{site}}}}$$

where n_block is the number of blocks per site, n_site is the number of sites (i.e., $n_block=n_site=2$ given our experimental design).

Phenotypic correlation among sites and traits were calculated based on the Pearson' correlation after averaging the observed phenotypic values over the two blocks for each accession (if an accession did not have an observed value in one of the two blocks, the available phenotypic value was used instead of the average).

II-3-4-Genomic data and Genome Wide Association (GWA) analysis

The 404K core SNPs dataset was downloaded from the IRRI SNP-Seek website (https://snp-seek.irri.org/_download.zul). SNP having more than 5% missing data or a minor allele frequency below 2.5% were removed, retaining 186,229 SNPs for 3,024 accessions. Remaining missing states were imputed using Beagle v.4.1 (21Jan17.6cc; Browning and Browning, 2016).

Without further filtering, GWA analysis was performed on the 253 accessions with the BLUE values for grain Zn concentrations and the 186k genotype matrix using the multi-locus random-SNP-effect mixed linear model (mrMLM) software package, which includes the mrMLM, FASTmrMLM, FASTmrEMMA, pkWmEB, pLARmEB, ISIS EM-BLASSO methods (https://cran.r-project.org/web/packages/mrMLM/index.html). A kinship matrix was calculated by mrMLM by default using the method of Kang et al. (2008) and default values were used for the parameters in all methods. To account for additional population structure a set of principal components (PC) was calculated using TASSEL (v5.2.75). PCs explaining more than 5% of the variation were included in the GWA analysis by indicating the type of population structure (PopStrType) = "PCA". An output of Quantitative Trait Nucleotides (QTN) exceeding a threshold LOD value >3 at each of the six multi locus models was generated as the last step of the analysis, and visualized in a combined Manhattan plot. QTN exceeding this LOD threshold in at least three of the six models were considered significant and evaluated further.

The allele effect at each locus was determined by calculating the average phenotypic values of all accessions carrying either allele and a box-plot graph was generated using an in-house R script. A graphical representation of subset of SNPs surrounding the significant QTNs was generated by the Haploview 4.2 software (Barret et al., 2005). Linkage disequilibrium (LD)

blocks were then identified and manually delignated based on the recombination rate, which is displayed using the standard color scheme: D'/LOD (wherein red color reveals linkage disequilibrium between two genetic marker, D' = 1 and LOD > 2).

II-3-5-Genomic prediction

Genomic prediction was performed with the GBLUP model (Meuwissen et al., 2001) using the rrBLUP package (Endelman, 2011):

$$\mathbf{g} = 1\boldsymbol{\mu} + \mathbf{Z}\mathbf{u} + \mathbf{e}, \quad \mathbf{u} \sim \text{MVN}(0, \mathbf{G}\sigma_{\mu}^{2}), \quad \mathbf{e} \sim \text{MVN}(0, \mathbf{I}\sigma_{e}^{2})$$

where g is the Zn BLUE values, 1 is a vector of ones, μ is the grand mean, Z is the design matrix, u is the vector of genotypic values, e is the vector of residuals, 0 is a vector of zeros, G is the genomic relationship matrix, σ_u^2 is genetic variance, I is an identify matrix, and σ_e^2 is the residual variance. The genomic relationship matrix was calculated by using the A.mat function in rrBLUP package, as described in Tanaka et al. (2021).

By using the above GBLUP model, Zn concentrations of the all 3 K accessions were predicted with three slightly different training sets: (1) all phenotyped accessions (n=253), (2) all phenotyped accessions excluding IRIS_313_9368, which had extremely high Zn concentrations and may therefore be highly infuential (n=252) and (3) excluding the six members of the aus subspecies (n=247). In addition, tenfold cross-validation was repeated 10 times to evaluate the prediction accuracy within the phenotyped accessions. Prediction accuracy was evaluated by taking correlation between the BLUE values (g) and the predicted genotypic values from the GBLUP model (u).

II-3-6-Confirmatory experiments

Two subsequent experiments were conducted to confirm results obtained with the training set. To independently confirm the reliability of the GP model, 61 additional accessions from the 3K set available at IRRI were selected for the determination of grain Zn concentrations. These accessions were selected based on their predicted grain Zn concentrations being either high (n=19), intermediate (n=24) or low (n=18). Accessions had not been grown in Madagascar but seed produced at IRRI and distributed by IRRI to JIRCAS was used directly for the determination of grain Zn concentrations. After acid-digestion of 0.25 g dehulled seed,

elemental concentrations in samples were measured using ICP Emissions Spectrometer ICPE-9000 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

A further experiment was conducted to investigate wether the high grain Zn concentrations identified in potential high-Zn donor accessions were repeatable and stable across several field sites in Madagascar. Three high-Zn accessions of the training set (IRIS313-9368, IRIS313-10114 and CX158) were grown in a multi-location trial together with local (X265) and international (IR64) check varieties. The experiments were conducted in the central highlands of Madagascar during the 2018-19 rainy season, using five farmer's fields with two fertilizer treatments (zero input versus fertilization with NPK) and three replications. Plot sizes were 2m². Grain samples were processed as for the training set and sent to Flinders University for the determination of elemental concentrations as outlined above.

II-4 Results

II-4-1-Phenotypic variation

The measured grain Zn concentrations (Zn) for the 253 tested accessions ranged from $16.2 - 51.0 \,\mu g$ g-1 at the Anjiro site and from $13.6 - 41.8 \,\mu g$ g⁻¹ at the Ankazo site (Fig. 2) and at both sites accession IRIS_313_9368 had highest values. In addition to having wider variation, the Anjiro site average of 25.4 μg g⁻¹ was significantly higher (p < 0.01) compared to Ankazo with 21.6 μg g⁻¹. Despite these differences, grain Zn concentrations at both sites had a tighter correlation (r = 0.65) compared to other traits with the exception of days to heading (r = 0.86). The average grain yield (GY) was 4.4 t.ha⁻¹at Anjiro and 4.2 t.ha⁻¹ at Ankazo and respective

straw weight (STW) means were 29.7 and 28.2 g plant⁻¹ (Figure. 2). Neither trait differed significantly between sites.

Figure 2:Repartition and correlation of zinc concentration (Zn), grain yield (GY), shoot weight (SWT) and heading date (HD) at sites Ankazomirimotra (AZ) and Anjiro (AJ).

Correlations between the two sites were low for GY (r = 0.15; p < 0.05) and slightly higher for SWT (r = 0.28; p < 0.001). However, at each site GY was positively correlated to SWT (r = 0.28; p < 0.001).



0.55 and r = 0.61 for Anjro and Ankazo, respectively; p < 0.001 for both). Accessions showed large variation for heading date (HD), ranging from 60 to 127 days at Ankazo and from 64 to 129 days at Anjiro. The similar range and high correlation of r = 0.86 indicated that site effects were very small for HD. Late heading was associated with increased SWT at both sites but the effect of late heading on GY was site-specific, with a moderatly positive effect at Anjiro (r = 0.32; p < 0.001) but a small negative effect (r = -0.11; ns) in Ankazo (**Figure.2**).

Interestingly, Zn concentrations showed weak correlations with other traits, except for a moderately negative correlation with GY in Anjiro (r = -0.33; p < 0.001). Furthermore, the broad-sense heritability for Zn concentrations across sites was high (H2 = 0.79), implying that genotype by site interaction effects for Zn concentrations were small. For that reason, the

association mapping and genomic prediction were conducted with the across-site BLUE values to analyze the common genetic control across two sites.

The 253 accessions tested belonged primarily to the indica sub-species of rice, the second biggest group were japonica accessions while other sub-populations were represented by only 6–10 individuals (Fig.3a). The focus on mostly i ndica accessions was due to the preference for indica-type varieties by lowland rice growers and consumers in Madagascar. The aus sub-species group had the highest average grain Zn concentration (33.5 μ g g⁻¹), compared with an average of 25.1 μ g g⁻¹ for the indica group and 28.4 μ g g⁻¹ for the japonica group.

II-4-2-Genome-wide associations for grain Zn concentrations

A multi-locus GWAS approach considering results from six multi-locus analysis methods was employed to identify genetic associations with grain Zn concentrations and associations were considered significant when the estimated LOD surpassed the threshold of 3.0 in at least three methods. Based on these criteria, eight loci associated with grain Zn concentrations were detected on chromosomes 2, 4, 8, 10, 11 and 12 (Table 4).

The full list of all QTN with a LOD>3 in any of the six methods is shown in **Annex1** and the corresponding Manhattan plots in **Annex 2**. The strongest peak identified in terms of maximum LOD value (16.4), number of approaches identifying the locus (5) and consistently high QTN effect estimates (1.69–3.69 μ g Zn g–1) was QTN_11.3 at 28,757,650 bp on chromosome 11 (**Table 4; Annex1**). The minor allele frequency (MAF) at this locus was 4.4% and the R2 was 15.4. The remaining seven loci had comparatively minor effects with R2estimates of 2.1–5.9 and maximum QTN effect estimates between 0.9 and 1.9 μ g Zn g–1 (Table 4).

Tableau 4: Associations for grain Zn concentrations detected (with LOD>3.0) in at least three of the six multi-locus approaches employed. For R2 and QTN effects, highest estimates by any of the significant approaches are shown.

QTN	Chromosome	Position	mrMLM	FASTmrMLM	FASTm- rEMMA	pkWmEB	pLARmEB	ISIS EM- BLASSO	<i>R</i> ²	MAF (%)	$\begin{array}{c} QTN \; effect \\ (\mu g \; Zn \; g^{-1}) \end{array}$
2.1	2	18,697,369	5.1	3.2	4.9	3.2			5.5	45.9	1.2
4.1	4	20,025,747		7.8		3.7	4.2		5.9	20.6	1.2
8.1	8	26,505,039		7.5	6.5	6.7	5.6		3.0	10.7	1.9
10.1	10	14,217,374	4.4	3.6		7.6	4.1	3.9	3.5	5.5	1.5
11.1	11	26,546,816	4.3	6.2		8.6	6.2		4.9	13.0	1.2
11.2	11	27,604,708		6.0	3.2	7.4			3.2	15.6	- 1.4
11.3	11	28,757,650	15.2	10.4		13.6	16.4	3.6	15.4	4.4	3.7
12.1	12	7,184,806	3.1	4.8		3.9			2.1	9.7	0.9



Figure 3:Variation in grain Zn concentrations in accessions from five rice sub-populations: a measured data of the training set (n=253); b predicted values of the entire 3 K set using the full training set (n=253); c predicted values of the entire 3 K set using a training set excluding six aus accessions (n=247).

At each QTN we investigated to what extent the minor allele and the allele increasing grain Zn concentrations was associated with different rice sub-populations (Fig. 4). For QTN_2.1 allelic variation was detected in all sub-species except for japonica but differences were only

significant in the indica group. QTN_8.1 had allelic variation within the aus and indica groups but mean differences were not significant. QTN_11.2 allelic variants existed within all subspecies and the minor allele significantly increased grain Zn in the aus and indica groups.



Figure 4:Grain Zn concentrations for the two allelic groups in the fve sub-populations for QTN_2.1, QTN_8.1, QTN_11.2 and QTN_11.3. Num bers above bars indicate the number of accessions in the respective group.

For the strongest QTN_11.3, the minor allele was associated with higher grain Zn concentrations in the aus, indica and japonica sub-species (Fig. 4). At QTN on chromosomes 10 and 12 allelic variation was only detected within the indica group and the minor allele increased grain Zn (**Annex 1**). In only one case (chromosome 11: 27,604,708), the minor allele was associated with reduced grain Zn and the allelic diference was only pronounced in the aus and japonica groups where it reduced grain Zn by 24 and 19%, respectively. For the most influential locus QTN_11.3, we delimited the linkage block surrounding significant QTNs. Strong linkage that would define a clear block was not detected but similarities between SNP genotypes were suggestive of a linkage block extending from 28.681 to 28.798 Mbp (**Annex 3**). This region contained 26 gene models of which 18 were functionally annotated (Table S2).

One gene family was strongly overrepresented at this locus as 11 genes were annotated as glucosyl hydrolases or, more specifically, as either class III chitinase homologs or xylanase inhibitors. In addition, two "thaumatin family domain containing proteins" and two Zinc finger proteins were annotated in the target region.

II-4-3- Genomic prediction for grain Zn concentrations.

Utilizing the same GWAS dataset as a training set, a GP model was developed to predict grain Zn concentrations of the entire set of 3 K accessions.

The full model including all 253 training accessions predicted grain Zn concentrations to range from 17.1 μ g Zn g–1 to as high as 40.2 μ g Zn g–1 (**Figure. 3b**). Differences between subpopulations were pronounced, with the aus group having highest predicted values and an average of 30.3 μ g Zn g–1. The second highest average was predicted for the japonica group (26.7 μ g Zn g–1) and the lowest for the indica group (23.2 μ g Zn g–1). In fact, only members of the aus sub-species were found among the top 20 predicted accessions (**Annex 4**) and IRIS_313_9368, which had the highest grain Zn concentrations in the training set (42.0 μ g Zn g–1), was also the highest predicted accession (40.2 μ g Zn g–1). The training set contained only six aus accessions, among which IRIS_313_9368 may have been highly influential. To test to what extent the small number of aus accessions may have skewed predictions, two additional GP models were tested, a 2nd model excluding IRIS_313_9368 and a 3rd model excluding all six aus. Predicted values of the 3rd model are shown in comparison to the full model in **Figure. 5.**

Excluding aus from the training set did not have major effects on predicted values for the four non-aus subpopulations, but strongly decreased the predicted grain Zn concentrations of the 201 aus accessions among the 3 K set. Their average decreased from 30.3 to only 24.3 μ g Zn g–1, which was lower than the predicted average of the japonica group (26.6 μ g Zn g–1) using the same training set (Figure. 3c). Only excluding IRIS_313_9368 did not have comparably strong effects, though the predicted Zn concentrations in aus accessions decreased from the full model (Annex 5). Tenfold cross-validation was performed to evaluate the accuracy of predictions for the full model and the one excluding aus accessions.



Predicted grain Zn (µg g⁻¹) using all accessions (n=253)

Figure 5:Predicted grain Zn concentrations of the entire 3 K set of accessions available at the IRRI gene bank based on two different training sets. Predictions shown on the x-axis are based on the entire set of 253 accessions tested in Madagascar, whereas predictions on the y-axis are based on only 247 accessions with all six members of the aus sub-population omitted.

When using all phenotyped accessions, average prediction accuracy of the ten replications was r=0.51 with the standard deviation (SD) of 0.02. This dropped slightly to r=0.49 (SD=0.01) for the 2nd model and to r = 0.48 (SD = 0.01) for the 3rd model with aus excluded.

For an additional and independent confirmation of prediction results, grain Zn concentrations were determined in a different subset of accessions selected from the 3K set. These belonged to the aus (n=30), indica (n=24) and japonica (n=7) subpopulations (Figure 3). Seeds analyzed had been imported directly from the IRRI genebank and were thus not grown in Madagascar (though there was a small overlap with accessions in the field in Madagascar, n=11).

The correlation between measured and predicted values was r=0.74 (Figure. 6) and correlations with the 2nd model (r=0.66) or 3rd model (r=0.35) were lower (data not shown).

Predicted mean values separated the aus group (average $31.3 \ \mu g \ Zn \ g-1$) from the indica (23.6 $\ \mu g \ g-1$) and japonica (25.1 $\ \mu g \ g-1$) groups and measured means were within 1.0 $\ \mu g \ Zn \ g-1$ of predicted group means (31.7, 23.4 and 24.2 $\ \mu g \ Zn \ g-1$, respectively). For the main locus identified on chromosome 11 in GWAS (QTN_11.3), the positive minor allele was present in 12 of the 61 accessions. The allelic effect appeared to be significant with an average Zn concentration of 32.4 $\ \mu g \ Zn \ g-1$ for the minor compared to 26.3 $\ \mu g \ Zn \ g-1$ for the major allele



Figure 6:Independent validation of predicted grain Zn concentrations in a set of 61 accessions imported from the IRRI gene bank. Predicted values are based on the training set of 253 accessions grown in Madagascar and measured values are from seed distributed by the IRRI gene bank.

(Annex 1); however, all accessions with the minor allele belonged to the aus group and within that sub-species, allelic groups did not differ (32.4 vs. $31.1 \mu g Zn g-1$).

The second confirmatory experiment was conducted with potential high-Zn donors at five field sites and with two fertilizer treatments in Madagascar. The ANOVA indicated that genotypic differences were the dominant source of variation in this dataset (Figure. 7) and potential high-Zn donor IRIS313-9368 (aus) was consistently superior to other accessions, irrespective of sites and fertilizer treatments. With an average of 42.5 μ g Zn g–1, it surpassed its predicted grain Zn

concentration of 40.2 μ g Zn g-1. Furthermore, it had almost twice the Zn concentration of IR64 (21.7 μ g g-1) and more than twice compared to the Malagasy check X265 (18.6 μ g g-1). Other tested accessions were the top predicted indica CX158 and IRIS313-10114 and while CX158 failed to reach its predicted value of 32.0 μ g Zn g-1, IRIS313-10,114 matched its predicted value of 30.5 μ g g-1 to within 1% and was consistently superior to the check varieties, irrespective of site or fertilizer effects (**Figure.7**). As in the training set, plants had higher average grain Zn concentrations at both field sites in Anjiro (28.6–29.6 μ g Zn g-1) compared to Ankazo village (26.5 μ g Zn g-1), with Behenjy (25.0–25.9 μ g Zn g-1) being lowest. Applying NPK fertilizer had a small positive effect, increasing average grain Zn concentrations from 26.6 to 27.7 μ g Zn g-1) but this effect was only significant in two of the five sites (data not shown).



Figure 7:Variation in grain Zn concentration of five rice accessions across five field sites and two fertilizer treatments (no input and 120 kg ha-1 NPK compound fertilizer). Differences between accessions were the dominant source of variation, followed by differences between sites (see inlet of ANOVA table).

II-5 Discussion

Experiments were conducted with a diverse set of gene bank accessions and more than twofold variation in grain Zn concentrations were detected. Other traits such as GY or HD also varied considerably, but correlations between this variation and grain Zn concentrations were low (Figure. 2). Large differences in GY could have affected grain Zn concentrations, due to a possible dilution of Zn in the greater grain biomass of higher-yielding accessions and of the reverse effect in very low-yielding accessions. While excluding high-yielding varieties was no option because such material should be the target of any breeding program, we had omitted accessions with extremely low yield at any of the two sites as we considered these to be not sufficiently adapted to local conditions to provide reliable data. Possibly as a result of this precaution the correlation between GY and grain Zn concentrations remained very weak (r=-0.27; Fig. S1) and likely did not affect outcomes of the GWAS and GS studies. In addition, the heritability for grain Zn concentrations (H2=0.79) was larger than for GY (H2=0.40). High heritability (>0.70) for grain Zn has also been reported elsewhere (Swamy et al. 2016, 2018; Baertschi et al. 2021). A rather high heritability and good correlations for grain Zn concentrations between different sites did, however, not mean site effects were absent. Grain Zn concentrations differed significantly and consistently between sites, with samples from Anjiro village (25.4 µg g-1) having significantly higher grain Zn concentrations compared to the Ankazo site (21.6 µg g-1) and this may have been due to poor drainage in Ankazo, which could lower Zn availability due to a more reduced soil state. Nevertheless, neither site can be described as Zn deficient considering our observed ranges were comparable to or higher than in similar studies (Norton et al. 2014; Swamy et al. 2018; Rao et al. 2020).

All rice grain analyzed was unpolished brown rice, which was primarily due to the fact that high-quality milling equipment capable of polishing rice without contaminating samples with Zn during the milling process was not available in Madagascar. To what extent our analysis of brown rice could have affected results and conclusions were briefly assessed by polishing a small sub-sample of grain and results indicated that the average grain Zn concentrations decreased by 18% from 33.2 μ g g–1 in brown rice to 27.2 μ g g–1 in polished rice (Fig. S6), which is similar to reductions reported elsewhere (Suman et al. 2021). Interestingly, the reduction was larger in low-Zn accessions (–24.5%) compared to high-Zn accessions (–14.2%),

which would indicate that using brown rice samples would not have induced a bias in favor of high-Zn accessions in our analyses.

II-5-1-Differences between rice sub-populations

The association panel used was predominantly of the indica sub-population with smaller additions from the aus, japonica, aromatic and admix groups, and measured grain Zn concentrations indicated significantly higher concentrations in the aus group (Fig. 3). The average of the aus group was 35.6% higher compared to the indica group and this superiority could subsequently be substantiated (+35.4%) in the confirmatory set including a much larger proportion of aus accessions. Considering that indica are the predominant group of varieties grown by lowland rice farmers of Madagascar and many other biofortification target countries, aus accessions identified here experimentally or through GP should be considered as potential donors in biofortification programs. Norton et al. (2014) reached a similar conclusion as 3 of the 5 high-Zn donor accessions identified in that study belonged to the aus group. The inclusion or omission of aus accessions did not affect the ability to predict grain Zn in non-aus groups but omitting the aus led to a strong under-estimation of grain Zn in that group (Figs. 3 and 5). Thus, some largely aus-specifc genetic factors must exist that lead to the superior grain Zn in that group and a GP approach appears to accurately consider these. A similar conclusion about the need to include all sub-populations in the training set was reached by Grenier et al. (2015). Considering that many components' traits lead to high grain Zn, it is likely that some of these component traits are only or at least predominantly expressed in the aus group. Such traits would make ideal breeding targets and physiological studies need to investigate if such ausspecifc traits exist and which limiting step in the processes between Zn uptake, transport, retranslocation and endosperm loading they affect. Understanding such bottleneck traits and the underlying genetic control may be key to increasing grain Zn concentrations in the predominantly indica modern cultivars. One possible aspect to study further in this regard is the tendency of aus accessions like IRIS313-9368 to rapidly senesce at maturity, whereas modern indica varieties have the tendency to remain comparatively green at maturity. More rapid senescence could favor Zn remobilization and translocation to grains. Donors from the aus group have been used repeatedly to move alleles for tolerance to many abiotic stresses into the modern rice breeding pool (Heredia et al. 2021). It is furthermore interesting to note that several aus accessions possess high tolerance to Zn deficiency (Lee et al. 2018) due to their efficient Zn uptake capacity from highly reduced soil. While it is not known whether a link between this Zn uptake efficiency from Zn deficient soil and high grain Zn concentrations under normal Zn availability exists, it would be very interesting to pursue such a possibility further. The use of aus donors in rice breeding has typically involved the transfer of major genes or QTL through their marker-assisted introgression into modern breeding lines and to what extent this is a likely approach to improve grain Zn remains to be resolved.

II-5 -2- GWA and GP analysis

Results of Norton et al. (2014) and Swamy et al. (2018) suggest that grain Zn is a polygenic trait controlled by multiple small to medium effect loci. Employing a multi-locus GWAS approach should therefore be more suitable in identifying loci controlling grain Zn concentrations compared to single-locus models that test one locus at a time without considering interactions between loci (Xu et al. 2018). A weakness of the single-locus GWAS analysis is the problem of false positives and negatives and this is better balanced in the multi-locus association analysis employed here, which eliminates the need for a Bonferroni correction in multilocus GWAS (Wang et al. 2016).

This study identified eight QTN of which seven had minor effects while the QTN on chromosome 11 (28,757,650) can be considered a medium-effect locus. It is attributed to a rare allele present in accessions of the aus, japonica and indica sub-species and the difference in average grain Zn concentration between the minor ($32.1 \mu g Zn.g^{-1}$) and major ($23.2 \mu g Zn.g^{-1}$) allele groups at this QTN is $8.9 \mu g Zn.g^{-1}(+38\%)$. This contrasts with the estimated QTN effect of $3.69 \mu g Zn.g^{-1}$ obtained by the multi-locus analysis. This would indicate a strong overestimation of QTN effects if individual loci are investigated in isolation and that the multi-locus model may provide lower but more realistic estimates of QTN effects. Other QTL or GWA studies have identified loci on chromosome 11 (summarized by Swamy et al. 2016, 2018) but these do not overlap with QTN_11.3 identified here. Conversely, we did not detect an otherwise commonly identified locus on chromosome 7 that is potentially linked to the OsNAS3 gene considered a prime candidate for increasing grain mineral concentration (Johnson et al. 2011). Predicted gene models for the candidate region at QTN_11.3 (28.681–28.798 Mbp) did not contain genes previously associated with Zn metabolism or transport. Instead, a cluster of 11

genes belonging to the glucosyl hydrolase family (class III chitinase homologs or xylanase inhibitors) were present. However, it is beyond the scope of this paper to further analyze any potential role of these genes. Whereas several QTL and GWAS studies have been reported in the literature this is only the second report applying GP for grain Zn concentrations in rice. In contrast to the work by Baertschi et al. (2021) that focused on assessing the potential of GP models for early selection of families to improve upland rice synthetic populations, the aim of the GP approach taken here is to predict grain Zn concentrations of gene bank accessions in lowland rice. If successful, this would allow for a very efficient search of potential new donors for high grain Zn concentrations. The prediction accuracy of 0.51 achieved in this study is similar to the PA ranging from 0.33 to 0.69 in wheat (Velu et al. 2016), of 0.43–0.73 reported for maize (Mageto et al. 2020) and of 0.51 in upland rice (Baertschi et al. 2021). The present study was conducted in two low-input farmers' fields rather than under the more controlled conditions one may encounter on research farms and that the PA achieved here is comparable to PAs reported from research farms is further suggestive of GP being a suitable approach for identifying potential donors from gene banks. It is furthermore noteworthy that the GP model based on field data from Madagascar was able to reliably predict (r = 0.74) grain Zn concentrations of the confirmation set that had been grown on the IRRI farm in the Philippines, which represents a more favorable environment compared to the low-input farmers' fields providing the data for the training set. Thus, the confirmation outside the training environment lends further credibility to the predictive ability of GP for grain Zn concentrations. Such robustness across environments would offer options to further economize resources through sparse testing of only part of the entire training set at each site or environment. Baertschi et al. (2021) suggested optimizing the GP scheme by evaluating small training sets and using phenotypic correlation between sites to calibrate the model, and in their case the phenotypic correlation for grain zinc concentration between sites (r2>0.41) was similar to what was achieved here. In a review of genomic approaches to biofortification of cereals, Koc and Karayigit (2021) concluded that conventional breeding would be the most sustainable, low cost and easily adoptable strategy. Our results concur inasmuch none of the QTN identified would be influential enough to be rapidly employed in marker-assisted selection. However, the success of GP in predicting grain Zn concentrations, here of gene bank accessions, but elsewhere in a rice breeding population (Baertschi et al. 2021), may offer opportunities, especially where

genomic selection of other traits is already practiced. It should furthermore facilitate utilizing the high-Zn donors identified here, as breeders may be reluctant to employ such exotic material in a conventional elite breeding program. As efforts are under way to mainstream biofortification traits in crop breeding (Virk et al. 2021), it seems worthwhile to include grain Zn concentrations as one of the traits targeted in genomic selection.

II-6 Conclusions

Data obtained from field experiments conducted in Madagascar enabled us to successfully predict grain Zn concentrations among a set of gene bank accessions, thereby identifying potential donors for use in Zn biofortifcation breeding. The most promising donors all belonged to the aus sub-species of rice and to significantly increase Zn concentrations in the lowland rice breeding pool, which is predominantly belonging to the indica sub-species, it appears necessary to rely on aus introgressions. Donor of the aus group has been used repeatedly for the introgression of major abiotic stress tolerance loci through their marker-assisted introgression. This approach is less likely to be successful for the improvement of grain Zn concentrations as none of the identified loci identified here or elsewhere appear strong enough to raise grain Zn concentrations would likely require the transfer of many small-effect loci simultaneously. Since we have shown the suitability of GP in identifying high-Zn donors, it can be expected that breeding populations developed from such donors could achieve target grain Zn concentrations if a similar genomic selection approach was used during the variety development process.

PARTIE 3: Stability of grain Zn concentrations across lowland

rice environments of Madagascar favors zinc biofortification

breeding. *

* This chapter is adapted from:

Mbolatantely Rakotondramanana, Matthias Wissuwa, Landiarimisa Ramanankaja, Tantely Razafimbelo, James Stangoulis, Cécile Grenier

Received: Frontier in Plant Science., 13 February 2024 Sec. Plant Breeding Volume 15 - 2024 https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1293831

III-1 Resumé

Des essais multi-environnementaux ont été menés dans les hautes terres et la partie nord-ouest de Madagascar afin de sélectionner des lignées à haut rendement et à forte concentration en zinc. L'expérience de la première année a été menée avec 23 à 28 riz biofortifiés, dont des variétés cultivées par les producteurs, IR64 utilisé comme témoin dans toutes les expériences et IR68144 qui avait fréquemment été utilisé pendant la première année comme témoin à haute teneur en Zn. La stabilité du rendement et de la teneur en zinc des lignées sélectionnées a été étudiée dès la première année sur sept sites sans application d'engrais. L'analyse combinée de variance et GGE Biplot ont été effectués. Des essais agronomiques ont été menés durant la 2em année avec les cinq lignées CIAT biofortifiées les plus performantes de la première année et les deux donneurs sélectionnés dant le 1er chapitre. La concentration en zinc (Zn) des échantillons a été mesuré à l'aide d'ICP-MS et 21 plantes ont été récoltées et pesées pour l'estimation du rendement (GY). Des statistiques de base ont été appliquées pour observer les données. BLEU a été utilisé pour effectuer le graphique à l'aide de packages ggplot2 basés sur les modèles mixtes des packages MASS. Les effets fixes et aléatoires sont spécifiés par les caractéristiques des expériences par année.

Sur la base des analyses de Zn des variétés locales ou locales améliorées les plus cultivées et consommées, la valeur de référence pour le Zn a été évaluée à 18,3 µg g-1 pour les hauts plateaux du centre et 20,8 µg g-1 pour la côte nord-est.

Dans l'expérience de la première année, G (Genotype/variété), E (Environnement) et GEI (Interaction Environnement Genotype) ont également contribué au GY contrairement au Zn dont la variation est principalement due au G. La variété X265 a obtenu le GY le plus élevé dans le méga-environnement MAR1a-ANJ1 et BF156 était le vainqueur en ANK1-MAR1b mais le Zn le plus bas dans tous les essais. Les lignées biofortifiees variaient considérablement et les meilleures lignées atteignaient 33 µg g-1 dans ANJ1. Sur la base de cette évaluation sur le terrain de la première année cinq lignées biofortifiees (BF109, BF110, BF055, BF021 et BF156) ont été sélectionnées pour des essais agronomiques au cours de l'année 2. Dans l'expérience de l'année 2, GY est le plus fortement affecté par le facteur E (26 %), suivi des effets GEI (12 %) et G (10 %). En revanche, Zn est principalement affecté par la variation liée à G (75 %) alors que les effets GEI et E sont faibles, 5 % et 4 %, respectivement. La réponse la plus prononcée au NPK a été détectée à BEN2a où GY a plus que triplé de 1,38 ± 0,99 à 3,23 ± 1,13 t ha-1. Un effet de la fertilisation NPK sur le Zn n'a été détecté dans aucun environnement. La variété locale améliorée X265 a obtenu le GY le plus élevé tandis que BF109 a un GY et un Zn élevés.

La légère différence de ligne de base entre les 2 sites (Haute Terre et côtier) est due à l'effet saisonnier typique dans la mesure où le Zn a tendance à être plus élevé dans les essais irrigués que pendant la saison sèche. BF110 et BF156 représentent un bon compromis entre la productivité et la biofortification. Elles ont ensuite été sujette à l'homologation de variété. Mais malgré l'atteinte des objectifs de GY et de Zn, leur faible exertion paniculaire (données non présentées) les a empêchées à être acceptées comme les premières variétés biofortifiées en Zn à Madagascar.

III-2 Introduction

Zinc is an essential micronutrient for the growth and development of all living organisms including human beings (Broadley et al., 2007), however one-third of the human population consumes insufficient quantities of Zn to sustain a healthy life (Hotz and Brown, 2004). Zn deficiency particularly affects children and women, with related health problems such as stunting, loss of appetite, impaired immune function, diarrhea, eye and skin lesions, weight loss, delayed healing of wounds, and mental lethargy (Hotz and Brown, 2004; Galetti, 2018). Zn deficiency together with other micronutrients and vitamin deficiencies have been termed "hidden hunger" (Kennedy et al., 2003) and their alleviation is considered one of the top ten priorities of humankind as defined in the Sustainable Development Goals (Goal 2.2: End all

forms of Malnutrition).

Madagascar is one of the countries severely struggling with micronutrient deficiency or hidden hunger (UNICEF-WHO-The World Bank, 2017). Zinc deficiency is a particular concern among children in the central highlands of Madagascar where a high prevalence of stunting (59.9%), wasting (6.0%) and underweight (40.1%) have been attributed to insufficient Zn intake (Shiratori et al., 2018). Rice is the staple food of Malagasy people, it is eaten three times a day and provides 50-80% of the daily caloric intake (WFP, 2016), however, rice is not a good source of dietary Zn (Frossard et al., 2000) and may only provide one fifth of daily needs (Sharma et al., 2013). This would be of little concern if the daily diet will be augmented by the consumption of better sources of Zn such as animal products like milk, cheese, red meat or seafood (Frossard et al., 2000). However, such dietary diversification is frequently not practiced in low-income countries like Madagascar where resource-poor families have insufficient funds to diversify their daily diet (Shahzad et al., 2014).

Preventive supplementation of Zn, and Zn fortification of processed foods have been used to reduce Zn deficiency related problems, but these approaches have had limited impact because of the recurring costs of providing a weekly or daily dose and because of the difficulty of delivering them in rural regions where 80% of the Malagasy population resides (Berti et al., 2014). A promising alternative would thus be to increase the Zn content in the main staple food consumed daily by the targeted population. Increasing micronutrient concentration in the edible part of crops is the concept of crop biofortification. There is a high probability that the introduction of Zn biofortified rice in Madagascar would be a sustainable, and cost-effective solution to alleviate nutritional Zn deficiency (Bouis & Welch, 2010). The prevalence of rice in the Malagasy diet and the fact that the rice consumed is a poor source of dietary Zn makes Madagascar a prime target country for rice Zn biofortification in Africa [https://bpi.harvestplus.org].

Biofortification involves producing staple food crops with enhanced levels of bioavailable micronutrients, targeting staples widely consumed by low-income families in Africa, Asia, and Latin America (Bouis, 2002; Hotz and Brown, 2004; Bouis & Welch, 2010). The focus is on providing sufficient levels of pro-Vitamin A carotenoids, and minerals such as Fe, and Zn, and taking existing consumption patterns into account rather than attempting to change such consumption patterns. This approach will not only reduce the number of severely malnourished

people who require treatment by complementary interventions but will maintain an improved nutritional status in the longer term. Successful examples of released Zn-biofortified crops include maize, rice, wheat and sorghum but for rice these cases are limited to Asia and Latin America (Andersson et al., 2017; Sanjeeva Rao et al., 2020; Virk et al., 2021), whereas no concerted effort has targeted the development of high-Zn rice varieties adapted to Africa to date. One strategy deployed for micronutrient biofortification is through plant breeding (Bouis & Welch, 2010). For a Zn biofortification breeding program to be successful, it is necessary to establish the baseline level of grain Zn concentrations in varieties currently grown in farmers' field. To date, such data is not available for Madagascar. However, based on the more extensive work done in Asia, it is assumed that polished, white non-biofortified rice typically contains 16 µg.g-1 Zn (Virk et al. 2021). To provide 40% of the daily requirement it was recommended to set the target of Zn in Zn biofortified rice varieties to 28 µg.g-1 (Bouis & Welch, 2010; https://www.harvestplus.org/crop/zinc-rice). The long-term breeding goal has thus been set at + 12 µg.g-1 Zn above the baseline to alleviate Zn malnutrition in populations relying predominantly on rice in their daily diet. The distribution of Zn in the rice grain is relatively uniform and removing the more nutrient-dense aleurone layer in polishing brown rice is only expected to reduce grain Zn concentrations between 15 and 20% (Sanjeeva Rao et al., 2020). Thus, the breeding target of 28 µg.g-1 Zn in white rice would correspond to about 34 µg.g-1 Zn in brown rice.

During the development of rice with increased grain Zn, other important traits need to be considered and of the many characteristics which have to be combined in a breeding program, both grain yield and grain zinc concentrations are genetically complex traits (Norton et al., 2014; Babu et al., 2020, Rakotondramana et al., 2022). Furthermore, it has been shown that agronomic management and environmental factors influence Zn uptake, translocation and loading into grains and that seasonal effects possibly linked to water supply and soil redox state further affect grain Zn concentrations (Inabangan-Asilo et al., 2019; Goloran et al., 2019). For grain yield, extensive genotype × environment interactions (GEI) are common in rice (Huang et al., 2021; Nguyen et al., 2023) and this necessitates multi-environment trials (MET) during variety development. Since GEI is only important when it causes significant changes in genotypic rankings in different environments, it is important for the efficacy of a breeding program to obtain estimates of the strength of GEI effects relative to genotype (G) and

environment (E) effects. Through studies providing estimates for the relative strengths of G, E and GEI effects it will be possible to select genotype that are stable across environments (Annicchiarico, 1997; Yan and Hunt, 2000) or to identify genotypes specifically adapted to certain environments (Blanche et al., 2009).

The effect of the environment on grain Zn concentrations is well established with factors such as soil and climate influencing average grain Zn concentrations at different sites (Wissuwa et al., 2008; Goloran et al., 2019). It is currently not known to what extent GEI plays an additional role and would have to be considered during the variety development process. Estimates of GEI for Zn vary from as low as 1.9% (Suman et al., 2021) to 27.4% (Babu et al., 2020). Rice breeding for grain yield and general adaptation in Madagascar is currently done separately for coastal, intermediate and high-elevation sites. It would be of practical significance to establish to what extent Zn-biofortification breeding should follow a similar pattern or would require additional environment-specific procedures.

Given the scarcity of data available on Zn levels in rice for Madagascar, the objectives of this study were (i) to determine baseline grain Zn concentrations in rice for Madagascar and to formulate breeding targets accordingly, (ii) to select breeding lines combining high Zn concentrations with high grain yield in farmers' fields at several Malagasy environments, (iii) to assess the strength of genotype, environments and GEI effects on grain Zn concentrations and grain yield, and (iv) to identify potential donors for the high grain Zn trait. To this end multi-environmental trials (METs) were conducted at several sites in the central highland and coastal rice growing regions of Madagascar using a set of Zn-biofortified breeding lines imported from CIAT/Colombia in comparison to local and international check varieties.

III-3 Materials and Methods

III-3-1 Evaluation sites and years

All germplasm included in this study were evaluated in farmers' fields at three sites in the Malagasy highlands, namely Anjiro, Behenjy and Ankazomiriotra, and one site located in the North-Western coastal region of Madagascar, Marovoay. This study was carried out over a two-years period in 2018 and 2019, with experiments in the highlands being conducted during the main rice season which coincides with the rainy season between November-May, whereas experiments at the irrigated coastal site were conducted during the dry, off season from June- October (Table 4). All experiments were conducted under lowland conditions: a 3 - 8 cm layer of standing water was maintained in bunded fields throughout the crop cycle, through surface irrigation with water drawn from small local creeks and canals. Weeding was done manually 3 and 8 weeks after transplanting whereas pest control was not necessary. Soil samples were taken from each field prior to land preparation and sent to a central laboratory for analysis of pH, available P (Olsen), total N and soil organic carbon (SOC).

II-3-2 Experimental materials

First-year observation trials were conducted with a germplasm set of 28 lines, of which 20 were Zn biofortified lines introduced to Madagascar from the CIAT rice breeding program, and six were local check varieties (Table 5). Two international check varieties were included to allow for the comparison to trials conducted elsewhere. These were the mega variety IR64 that has been widely evaluated in all the CIAT-HarvestPlus multi-environment trials (METs) and IR68144 which had frequently been used as a high Zn check in rice biofortification evaluation trials. Local check varieties differed between highland and coastal sites with X265 being the highland check as it is the commonly grown rice lowland variety in the region, whereas five different local varieties were used as checks for the Coastal region, because no single recommended variety exists.

Agronomic trials in year 2 were conducted with the five best performing biofortified CIAT lines from the first year based on their grain Zn concentration and yield, but also on general phenotypic adaptation (i.e. no lodging, good panicle, high number of tillers). In addition, local and international checks were included, as were two high- Zn accessions identified in a screen of nearly 300 genebank accessions (Rakotondramanana et al., 2022). Tableau 4: Environments used for the evaluation of grain yield and grain Zn concentrations during the main and off seasons of 2018 and 2019. The main season corresponds to the rainy season (November-May) in the highlands whereas the off-season in the coastal region from June -October relies entirely on irrigation. Temperatures, rainfall and Soil chemistry data collected in each field are given for the period of rice cultivation (6 months in the highlands and 5 months at the coast).

Year	ENV		Seas	Latitude, Longitude	Altit	Т	Rainf	Sowing, Harvesting	pН	As P	Org	Tot
			on		ude	(°	all	dates	wate	(mg.	С	al N
					(mas	C)	(mm)	(yyyymmdd)	r	kg-1)	(g.kg ⁻	(g.
					l)						1)	kg ⁻ 1)
2018	Ankazomiriot	AN V1	Main	19°66'45"S, 46°55'70"E	1016	21	1198	20181107,20190401	5.1	4.65	14.94	1.42
	Anjiro	ANJ1	Main	18°89'99"S,47°97'46"E	980	23	1059	20181108, 20190330	4.9	1.41	42.84	3.12
	Marovoay	MAR1a	Off	16°18'05"S,46°67'80"E	10	26	51	20190514, 20190822	5.2	3.42	21.64	2.04
	Marovoay	MAR1b	Off	16°17'80"S,46°68'58"E	10	26	51	20190514, 20190822	4.7	2.93	25.39	2.17
2019	Ankazomiriot	ANK2	Main	19°67'93"S,46°57'02"E	1016	21	1082	20191030, 20200325	5.5	3.70	9.39	0.94
	Anjiro	ANJ2a	Main	18°90'56"S,47°96'84"E	980	23	1326	20191029, 20200408	5.1	4.08	22.45	1.87
	Anjiro	ANJ2b	Main	18°90'73"S,47°97'30"E	980	23	1326	20191030, 20200408	5.0	1.67	35.89	2.73
	Behenjy	BEN2a	Main	19°20'74''S,47°48'20''E	1418	19	664	20191017,20200312	5.2	1.66	16.56	1.22
	Behenjy	BEN2b	Main	19°24'59"S,47°47'89"E	1418	19	664	20191016, 20200312	5.0	2.22	19.56	1.37
	Marovoay	MAR2a	Off	16°18'05"S,46°67'80"E	10	25	53	20200628, 20211010	4.9	2.52	18.29	1.68
	Marovoay	MAR2b	Off	16°17'13"S,46°66'87"E	10	25	53	20200628, 20211010	5.2	2.15	16.54	1.45

ID	Group	Designation	Year
BF001	BF-Line	CT19298-(100)-1-2-3-1-4MP	Y1
BF021	BF-Line	IR31917-45-3-2-1-2SR-1-M	Y1/Y2
BF035	BF-Line	CT23073-9-8-2	Y1
BF008	BF-Line	CT22061-1P-1SR-2P-3SR	Y1
BF011	BF-Line	CT22062-5P-3SR-1P-2SR	Y1
BF012	BF-Line	CT22062-5P-3SR-1P-3SR	Y1
BF014	BF-Line	CT22062-5P-3SR-2P-2SR	Y1
BF015	BF-Line	CT22062-5P-3SR-2P-3SR	Y1
BF045	BF-Line	CT22117-9P-1SR-2P-3SR	Y1
BF050	BF-Line	CT22118-1P-6SR-5P-1SR	Y1
BF051	BF-Line	CT22118-5P-1SR-1P-2SR	Y1
BF054	BF-Line	CT22129-2P-8SR-2P-1SR	Y1
BF055	BF-Line	CT22129-2P-8SR-2P-3SR	Y1/Y2
BF060	BF-Line	CT22135-9P-5SR-1P-3SR	Y1
BF109	BF-Line	CT23135-F4-61-M	Y1/Y2
BF110	BF-Line	CT23119-F2-7-1-3SR-3P	Y1/Y2
BF111	BF-Line	CT23110-F2-9-4-3SR-2P	Y1
BF153	BF-Line	CT22154-9P-1SR-1P-3SR	Y1
BF156	BF-Line	CT22128-5P-5SR-1P-3SR	Y1/Y2
BF105	BF-Line	CT23140-F4-38-M	Y1
IR68114	High zinc check	IR68144-2B-2-2-3-1-166	Y1
X265	Local check	X265	Y1/Y2
IR64	Mega variety	IR64	Y1/Y2
HP02	Local check	Tsipala_A	Y1
HP03	Local check	Sebota_281	Y1
HP04	Local check	Mahadigny	Y1
HP05	Local check	Varimanitra	Y1
HP06	Local check	Tsiresindrano	Y1
HP07	Local check	Vary Botry	Y2
HP08	Local check	Vary Mena	Y2
HP09	Local check	Tsemaka	Y2
HP10	Local check	Duralex	Y2
HP11	Local check	X243	Y2
10114	IRIS_313-10114	FACAGRO_64	Y2
9368	IRIS_313-9368	CHANDARHAT	Y2

Tableau 5:Germplasm tested during 2018 (Y1) and 2019 (Y2) field trials

III-3-3 Experimental layout and management

First-year observation trials included 23 entries in a Latin square design, with two repetitions. The second-year agronomic trials used a total of nine genotypes under a split plot design with mineral fertilizer application (NPK vs. no input) being the main factor and genotypes the sub-factor and the design being replicated three times per trial.

All experiments were conducted in farmers' fields. NPK fertilizer (11:22:16) was applied at a rate of 300 kg. ha⁻¹ in the first year and at rates of 300 kg.ha⁻¹ at highland sites and of 200kg.ha⁻¹ for the coastal Marovoay sites in the second year. In all highland experiments no supplementary irrigation was provided beyond what was available from rainfall and rainfed small creeks, whereas dry season experiments at the coastal site were fully irrigated. At all locations, each plot consisted of five 2 m long rows. Thirty days old seedlings were transplanted as a single seedling per hill with 20 cm spacing between and within rows.

At harvest, 21 plants within each plot were cut and panicles were separated from straw and air dried for a week in the laboratory. The weight of air-dried panicles was recorded to estimate grain yield (GY) in t. ha⁻¹. For the determination of grain Zn concentrations 10 panicles that were free of soil or other contaminants were sampled per plot and brought to the laboratory to be oven-dried for three days. Seeds of these panicles were dehulled manually avoiding metal contamination and 2-5 g dehulled grain per sample was sent to Flinders University, Australia, for determination of zinc concentrations by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). About 0.3 g of dehulled, brown, unbroken rice seed was oven dried at 80 °C for 4 h to remove remaining moisture, the exact weight and grain number was recorded, followed by acid-digestion in a closed tube as described in Wheal et al. (2011). Elemental concentrations of samples were measured using ICP-MS (8900; Agilent, Santa Clara, CA) according to the method of Palmer et al. (2014). A blank and a certified reference material (CRM; NIST 1568b rice flour) were analyzed every 30 samples for quality assurance. Samples with Al present at > 5 µg. g⁻¹ were considered to have unacceptable levels of purported soil contamination (Yasmin et al., 2014), thus they were eliminated from the dataset. Grain Zn concentrations (Zn) are given in μg . g^{-1} on a dry weight basis.

III-3-4 Statistical analysis

Basic statistics were applied to observe data, validate the assumptions for variance analysis and discard potential outliers based on the Cook's distance. Linear mixed models were used to partition variance into the sources of variation defined by the experiment. For the 2018 observation trials, the following model was used:

$$y_{ijkrc} = \mu + g_i + s_j + gs_{ij} + r_{jk} + row(r)_{rjk} + col(r)_{cjk} + \varepsilon_{ijkrc}$$
(Model 1)

Where y_{ijk} is the phenotypic value of genotype *i* in site *j* evaluated in the k^{th} rep, μ is the general mean of the experiment, g_i is the genotypic value of ith genotype, s_j is the effect of the jth site, gs_{ij} is the interaction between the ith genotype with the jth site, r_{jk} the effect of the kth repetition nested in the jth site, $row(r)_{rjk}$ and $col(r)_{cjk}$ the effect of the rth row and cth column both nested in the repetition, respectively, and ε_{ijkrc} the residual term. Model selection with all the terms was performed with the step AIC formula of the MASS package which choses a model by AIC in a stepwise algorithm. The design factors (repetition, row and column effects) were modeled as random effects while all other model terms are considered fixed effects.

For the 2019 agronomic trial, the model was as following:

 $y_{ijkl} = \mu + g_i + s_j + t_k + gs_{ij} + gt_{ik} + st_{jk} + gst_{ijk} + r_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$ (Model 2)

The effects are the same as in Model 1, with an additional t_k as the effect of the agronomic treatment (k = 1, 2), gt_{ik} the interaction between the genetic and the treatment, st_{jk} the interaction between the site and the gst_{ijk} the interaction between the ith genotype the jth site and the kth treatment, r_{jkl} the effect of the kth repetition nested in the jth site and kth treatment and ε_{ijkl} the residual term. Similarly, the model was selected following a stepwise algorithm (step AIC). Only the repetition factor was modeled as random effects while all other model terms were fixed effects.

Variance component estimates were obtained using the lmer function (R-CRAN, package lme4). For each factor in each trial the Eta² was calculated as
Mean comparisons, either to compare groups in the 2018 observation trial or in the 2019 agronomic trials were performed with the Tukey's HSD (honestly significant difference) test (p < 0.05) using the lsmeans package (CRAN-R). To compare genotypes against the baseline (X265) at each environment, the multiple t-test was performed with the Dunnett's test using DunnettTest function from the DescTools package.

Best linear unbiased estimated (BLUE) were obtained using the models per sites and used for the graphical visualization of the crop performance using ggplot2 and for the GEI studies. For the GEI plotting, two-way tables listing the average value of the genotypes for each environment were used. The GGE biplots were performed from the first two principal components (PC1 and PC2) that were derived from subjecting environmentcentered GY and Zn means for each environment (centering = "tester") to singular value symmetrically partitioned into the entry and the environment eigenvectors (SVP = "symmetrical") and with scaling of environment by standard deviation (scaling = "sd").

III-4 Results

III-4-1- Baseline zinc concentration of local check varieties

The recommended variety for the central highlands of Madagascar is X265 and its mean grain Zn concentration (Zn) ranged from 16.0 to 23.5 μ g g⁻¹ at Anjiro and Ankazomiriotra (**Table 4**), with an average across sites of $18.3 \pm 1.6 \mu$ g g⁻¹. For the coastal North-Eastern region, no single recommended variety exists, and we therefore determined Zn for the five most popular varieties Tsipala_A, Sebota_281, Mahadigny, Varimanitra, and Tsiresindrano. These local varieties ranged from 18.0 to 25.0 μ g g⁻¹ (**Table 7** and **Figure 8**) with an average of $20.8 \pm 2.0 \mu$ g g⁻¹. Based on these analyses we can define baseline Zn concentrations of 18.3 μ g g⁻¹ for the central highlands and 20.8 μ g g⁻¹ for the coastal North-West.



Figure 8: Grain Yield (GY) and Grain Zinc (Zn) of 6 local varieties and 21 biofortified rice compared with the mega variety IR64 that has been widely used in HarvestPlus multienvironment trials (METs) and IR68144 a high Zn check in rice biofortification evaluation trials under 2 highland sites (ANJ1 and ANK1) and 2 coastal sites (MAR1a and MAR2a) of Year 1.

Tableau 6:Distribution of grain yield (GY) and grain zinc concentration (Zn) among the six groups of materials considering all the experiments conducted in 2018.

		GY (t ha ⁻¹)		ZN (μg g ⁻¹)			
Group	range	mean	sd	range	mean	sd	
X265 ^(a)	2.54 - 6.22	4.75	0.67	16 - 23.5	18.31	1.56	
Local_var ^(b)	1.5 - 5.7	3.25	1.12	18 - 25	20.85	2.03	
BF-Lines	1.14 - 5.75	3.47	1.15	18.6 - 33	24.70	2.81	
IR64	1.19 - 6.25	3.87	1.21	19.7 - 30.1	22.17	1.94	
IR68144	1.09 - 5.13	2.97	1.28	22.1 - 29.3	26.24	2.67	

(a) Reported data from ANJ and ANK sites, (b) Reported data from MAR1 and MAR2 sites

III-4-2- Effects of genotype (G) and environment (E) on grain yield and grain zinc concentrations in year1.

The effect of E differed considerably between grain yield (GY) and Zn (**Table 7**). While the factors G and E and the G by E interaction (GEI) contributed almost equally to the variance for GY, the variance for Zn

was mainly due to variation between genotypes and a minor GEI effect. Average Zn were similar between environments (**Figure 8, Annex 6**) with a narrow range of 22.0 to 24.0 µg g⁻¹. In contrast GY ranged from as low as 2.1 t ha⁻¹ in MAR1a to 3.8 t ha⁻¹ in ANK1, 4.2 t ha⁻¹ in MAR1b and 4.4 t ha⁻¹ in ANJ1 (**Figure 8, Annex 6**). The range in GY could not be attributed to differences in soil properties, possibly because all sites were P deficient with Olsen-P values below 5 mg kg-1 and soil pH was in a narrow range around pH 5.0 (**Table 4**)

Tableau 7:Partition of variance for grain yield (GY) and grain zinc concentration (Zn) in the 2018 observation trials resulting from the linear mixed model (model 1)

	GY		ZN (μg g ⁻¹)			
	Sum Sq	Pr(>F)	Sum Sq	Eta ²	Pr(>F)	
Genotype (G)	30.63	37%	***	1327.04	76%	***
Environment (E)	26.66	33%	***	9.82	1%	ns
GEI	24.68	30%	**	403.09	23%	**

p-values ***, ** significant at <0.001 and <0.01, respectively

X265, the recommended variety for the highlands, had the highest average GY in three of the four environments (**Figure 8**) Yet, the range of GY varied notably, from as low as $3.2 \text{ t} \text{ ha}^{-1}$ in MAR1a to $4.9 \text{ t} \text{ ha}^{-1}$ in ANJ1. The group of 21 imported lines (BF-Lines) varied considerably across the sites. Half the BF-Lines had GY below 2 t ha⁻¹ in low-yielding MAR1a, and several were equal to or exceeded X265, especially at the MAR1b site. IR68144, was used as reference across environments for its relative stable high ZN, being the referential for HarvestPlus rice evaluation. Its grain yield was generally low while ZN was indeed among the highest with an average of 26.2 µg g⁻¹ compared to 22.0 µg g⁻¹ for IR64 and only 18.4 µg g⁻¹ for X265 (**Table 6**). BF-Lines had an average of 24.7 µg g⁻¹ with best lines reaching 33 µg g⁻¹. Compared to the high zinc

check, in all four environments at least one BF-Line had superior ZN, and in ANJ1 and MAR1a 9 and 10 surpassed the ZN observed in IR68144, respectively.

GGE biplots dissect the complex nature of GEI and simplify them into principal components (Component 1 and Component 2), which accounted for 57.0 and 23.6 % of the total GGE variation for GY and 68.9 and 15.1 % for ZN, respectively (**Figure 9**).



Figure 9:Which won where/GGE biplots for Grain Yield (a) and for grain zinc concentration (b) showing components 1 and 2 explaining the total variation using Symmetrical SVP and Tested-centered G+GE with scaling by standard deviation, Year 1.

The Which One Where/What feature highlights the best genotype in a specific megaenvironment as those plotted far from the biplot origin and closer to tested environments. For GY, X265 was 'winning' in the MAR1a-ANJ1 mega-environment and BF156 was the winner in ANK1-MAR1b (Figure 9A). For ZN the global grouping into megaenvironments was less clear, possibly because GEI as captured by Component 2 (15.1%) were smaller than for GY (23.6%). BF109 won in the MAR1a-ANK1 mega-environment whereas BF021 won in MAR1b and BF105 in ANJ1 (Figure 9 B). It was interesting to 56 note that national check variety X265 was placed by itself at the opposing end along Component 1.

The stability of the genotypes could be assessed with graphs on Mean vs. Stability (Fig 10) where the arrowhead line represents the average environment axis (AEA), and its length a measure of the relative importance of the genotype main effect (G) vs. the GEI. The perpendicular deviation from the AEA indicates the stability of a genotype with small deviations signifying high stability. Best average performance for GY across all environments was found for X265 with moderate stability while BF156 was the second best but slightly less stable (Figure.10A). BF109 was the best line for Zn and this was coupled with high stability while the second best, BF110, was less stable (Figure.10B).

Based on this year 1 field evaluation five BF-Lines (BF109, BF110, BF055, BF021 and BF156) were selected for further experiments in year 2. BF109 and BF110 were selected for their high average Zn, BF156 and BF055 for their stable aboveaverage Zn coupled with high GY in BF156 or high GY in the MAR1b environment for BF055, and elected for representing a certain amount of GEI as it had high ZN only at MAR1b (**Supplementary Fig. S1**). Agronomic field trials were conducted in 2019 in five locations (**Table.5**) It was therefore only tested further in the coastal region. These BF lines were compared to two checks common across all sites and years (X265 and IR64), and to two genebank accessions "IRIS" previously identified as having high ZN in Madagascar (**Table 6**).



Figure 10: Means VS Stability, a GGE biplots for Grain Yield (a) and for grain zinc concentration (b) showing components 1 and 2 explaining the total variation using Symmetrical SVP and Tested-centered G+GE with scaling by standard deviation, Year 1.

III-4-3-Effect of fertilizer treatment (T) on grain yield and grain Zn concentrations in year 2 trials.

Experiments in year 2 were conducted in five locations (**Table 4**) and differed from year 1 trials in as much as a zero-input treatment representing typical farmer's practice was added. At each site, the effect of omitting the NPK fertilizer application on GY and ZN could thus be evaluated. GY was most strongly affected by the factor E (35%), followed by G:E (21%), G (14%) and T (12%) effects (**Table.8**).

In contrast, ZN was predominantly affected by variation linked to G (83%) whereas G:E or E effects were small, 9% and 4%, respectively and T effect was not detected. Fertilization with NPK affected GY significantly and positively in 4 out of 7 environments (**Annex 7, Annex 8**). Average grain yield without NPK fertilizer ranged from as low as 1.1 ± 0.4 t ha⁻¹ at BEN2b to 3.5 ± 0.6 t ha⁻¹ at ANJ2a and the range obtained with NPK fertilizer applications was from 1.9 ± 0.6 t ha⁻¹ at ANK2 to 5.3 ± 0.8 t ha⁻¹ at

MAR2b. The most pronounced response to NPK was detected at BEN2a where GY nearly tripled from 1.2 to 3.3 t ha⁻¹. An effect of NPK fertilization on ZN was not detected in any environment (**Annex 7, Annex 8**).

Tableau 8:Partition of variance for grain yield (GY) and grain zinc concentration (Zn) in the 2019 agronomic trials resulting from the linear mixed model (model 2).

		GY		ZN			
	Sum Sq	Eta ²	Pr(>F)	Sum Sq	Eta ²	Pr(>F)	
Genotype (G)	30.229	11%	***	13553.3	78%	***	
Environment (E)	85.971	31%	***	682.7	4%	***	
Treatment Fertilizer (TF)	33.178	12%	***	17.2	0%		
G:E	46.401	17%	***	1379.6	8%	***	
G:	7.272	3%	**	108.3	1%	*	
E:TF	23.62	8%	***	96.6	1%	*	
G:E:TF	18.098	6%		475	3%	**	

p-values ***, **, *, significant at < 0.001, < 0.01 and < 0.05, respectively.



Figure 11:grain zinc concentration and garin yield for rhe Biofortified lines compared with iris lines and locals with IR64 and X265 as controls.

While average effects of NPK on Zn were not significant it is of interest to investigate whether higher GY in the NPK treatment led to a dilution of Zn. In the highly NPK-responsive site BEN2a GY of X265 doubled from 2.1 to 3.9 t ha-1 but Zn remained constant at just below 20 μ g g-1 and very similar values were observed at all other environments (**Figure.11**). The same pattern was observed for high-ZN genebank accession IRIS_313-10114 that doubled GY in BEN2a (1.7 to 3.4 t ha⁻¹) and marginally increased ZN from 28.3 to 30.7 μ g g⁻¹ under NPK. Even at the highest yielding site MAR2b with GY between 4.2 and 6.1 t ha⁻¹ in the NPK treatment, no consistent decrease in ZN was observed. The genebank accession IRIS_313-9368 more than doubled GY from 2.0 to 5.0 t ha⁻¹ in response to NPK in MAR2b, but its exceptionally high ZN remained above 42 μ g g⁻¹ (**Figure.11**).

That IRIS-9368 frequently had missing or extremely low values for GY was due to its very early maturity, which rendered it prone to attacks by rats in the highland environments as it was frequently the first rice to mature in the entire village. Despite the missing GY enough panicles could be harvested to obtain an estimate of Zn, which was the highest of all genotypes tested with a mean of $40.9\pm3.6 \ \mu g \ g^{-1}$ and a range of $36.3 \ to 51.7 \ \mu g \ g^{-1}$ across environments and treatments (**Figure 11**). Also, with a very narrow range but at the opposite spectrum for Zn with a mean of $19.4\pm2.2 \ \mu g \ g^{-1}$ was X265, which had the lowest Zn in 6 of the 7 environments. Among BF-Lines the highest average ZN was detected in BF109 and this was achieved with a GY that was generally not significantly different from X265 (except in BEN2a without NPK and ANJ2b with NPK, where BF109 yielded significantly lower) **Annex7, Annex 8**). The local improved cultivar X265 had either same or significantly higher GY compared to local farmer varieties ("Local") (**Annex 8**).

GGE biplots for year 2 trials were prepared separately for fertilized and unfertilized environments (Figure 12). For GY, Component 1 explained 44 and 36% of the GGE variation under no-NPK and NPK environments, respectively. Component 2, representing the GEI effect, accounted for 29 and 24% of the variation. Environments were consistently grouped into two mega-environments, one being defined by ANK2, MAR2a and a lesser extent ANJ2b, which were the environments with no response to NPK

fertilization (Supp. Figure S3a, b). The remaining four NPK-responsive environments formed the second mega-environment in which X265 was the winning genotype with relatively stable yield in the NPK treatment (Figure 12).

For Zn G effects along PC1 explained about 90% of the variation and E or GEI effects were therefore small (around 5% for PC2), causing all seven environments to cluster rather closely together (**suppl. Figure S3c,d/Annex11**). With little differences between environments for Zn we investigated to what extent genotypic means where stable across environments using the Mean vs. Stability GGE biplot. Local variety X265 and mega-variety IR64 were very stable, thus did not vary in their low Zn depending on environment (**Figure 12 c,d**).

Of the BF-Lines BF110 was the least stable and that was due to a higher frequency of intermediate Zn levels (Figure 12, Suppl. Table S3), whereas the overall higher Zn of BF109 did not come at higher instability. BF109 was also one of the most stable entries for GY, however, the overall level of GY was not among the highest (Figure 12 a,b).A core set of four BF lines together with X265 and IR64 had been repeated at all sites in both years and were used for a further GEI analysis across years and sites. For GY environments clustered independent of year or geographical proximity (**Figure 13 a**), e.g. MAR1b and ANK2 behaved similarly and BF156 and BF110 appeared adapted to these environments, whereas MAR1a and BEN2a were highly similar and X265 being most adapted.

As for individual years, the across-year analysis for Zn indicated that the factor G on PC1 was dominant, explaining about 90% of the variation while E and GEI effects only accounted for about 6% (Figure 13a). Unlike for GY, BF-lines clearly separated from both checks along PC1 and BF109 had the highest overall Zn without being associated with a specific group of environments.



Figure 12: Means VS Stability, a GGE biplots for Grain zinc concentration (a,b) and for grain Yield (c,d) showing components 1 and 2 explaining the total variation using Symmetrical SVP and Tested-centered G+GE with scaling by standard deviation, Year 2 under NPK and zero treatment.



Figure 13:GE biplots for Grain Yield (a) and zinc concentration (b) showing components 1 and 2 explaining the total variation using Symmetrical SVP and Tested-centered G+GE with scaling by standard deviation, across the two Years (2018 and 2019) under NPK treatment

III-5-Discussion

III-5-1- Baseline Zn and breeding targets for Madagascar

Madagascar is a high priority country for Zn biofortification in rice (https://bpi.harvestplus.org) and this assessment is based on the rate of per capita rice consumption, country rice production and the prevalence of Zn deficiencies in the country (Herrington et al., 2019). Very little data exists about typical grain Zn concentrations in major rice varieties of Madagascar. Only one study reported Zn of local varieties, showing a range of 16 to 27 μ g.g⁻¹ Zn in dehulled brown rice of 26 Malagasy local varieties with a mean of 24 μ g.g⁻¹ (Rakotondramanana et al., 2022). Among these, the varieties most commonly found in markets of towns and cities, Tsipala and Makalioka, contained 20 and 21 μ g.g⁻¹, respectively.

One objective of our study was to provide more basic data on ZN across varieties and environments of Madagascar. In the central highlands where much of the rice is produced and consumed, the recommended and frequently grown variety is X265. Based on our data from four regions and two years, we can establish that X265 is consistently among the varieties with low grain Zn concentrations, averaging just 18.4 μ g g⁻¹ Zn in dehulled brown rice. We therefore consider 18 μ g g⁻¹ to be the baseline for brown rice Zn in the central highlands where rice is grown during the rainy season. The coastal region of Madagascar has a much warmer climate and trials were conducted during the dry season, relying on irrigation. Different varieties from highland regions are cultivated, of which the five most popular were tested here. They ranged from 18 to 25 μ g g⁻¹ in brown rice with an average of 20.9 μ g g⁻¹, which one may consider the baseline for the coastal regions during the dry season. X265 averaged 19.0 μ g g⁻¹ in that region. The slightly higher ZN in the coastal area may be due to a typical seasonal effect: ZN tends to be higher in dry season compared to wet season trials (Goloran et al. 2019; Suman et al., 2021).

Polishing brown rice further reduces Zn by from 15 to 20% on average (Taleon et al., 2020). We can thus anticipate that our Malagasy baseline of 18 and 21 μ g.g⁻¹ estimated for brown rice would correspond to 15 to 17 μ g.g⁻¹ Zn in polished white rice, which is comparable to the Zn baseline of 16 μ g.g⁻¹ Zn assumed for rice generally (Bouis & Welch, 2010). Based on this typical baseline, the long-term breeding target for Zn biofortification in rice established by HarvestPlus is an improvement of Zn to 28 μ g.g⁻¹ in polished white rice (Virk et al., 2021). The Biofortification Prioritization Index (BPI) established by HarvestPlus assumes that such a level would deliver sufficient Zn via rice to alleviate Zn malnutrition in populations relying on rice as their primary food source (https://bpi.harvestplus.org). However, it is recognized that this long-term goal of +12 μ g.g⁻¹ Zn may require several breeding cycles to be achieved and a short-term goal of reaching at least 50% of target concentrations has therefore been suggested during the initial stage of biofortification breeding (Virk et al. 2021). Referring to brown rice, our short-term breeding target would thus be around 25 μ g.g⁻¹ in the highlands and 27 μ g.g⁻¹ for the coastal region.

III-5-2 - Levels of Zn in local varieties and breeding lines

Of the 35 breeding lines and varieties tested, 12 were popularly grown local varieties and none of these consistently reached this breeding target. Neither did the 26 accessions tested previously (Rakotondramanana et al., 2022). While many more local varieties exist in situ and in gene banks that should be evaluated for Zn, we cautiously conclude that reaching breeding targets likely requires outside genetic resources such as the 20 BF breeding lines imported from CIAT. Of these, several reached target Zn but only five combined this with acceptable grain yield and were selected for second year trials that included additional farmer's fields and a zero-input treatment representing farmers' practice in the region.

Two genotypes, BF110 and BF156 were identified as having good grain yield across both years (average of 3.7 and 3.8 t.ha⁻¹ in the NPK treatment, respectively) that was not significantly different from the 4.0 t.ha⁻¹ of X265. Their Zn was above the breeding target $(>25 \ \mu g.g^{-1})$. Even higher ZN was detected in BF109 (29.7 $\mu g.g^{-1}$) but grain yield was lower at 3. t.ha⁻¹ (+ NPK). BF110 and BF156 represent a good compromise between productivity and biofortification and were subsequently considered for variety release but despite meeting grain yield and Zn targets, their poor panicle exertion (data not shown) prevented them from being accepted as the first Zn biofortified varieties in Madagascar. This undesirable trait is often associated with increased susceptibility of the panicle to diseases that can negatively affect grain yields (Cruz et al., 2008). However, poor panicle exertion had not been observed in field trials in Latin America, ruling out a genetic origin. Other factors such as high temperatures occurring at the booting stage could be suggested (Cruz et al., 2008; Chen et al., 2020) but our understanding of this problem is still insufficient and requires further studies. While this problem prevents the utilization of BF110 and BF156 as a variety, a potential future for this germplasm would be to integrate them as parents in a breeding program of new biofortified rice for Madagascar. As such, other potential donors for the high Zn trait are BF109 and the two gene bank accessions confirmed to have superior Zn in year 2.

III-5-3- Stability of Zn across environments, years and treatments

In a study of variations for Zn across soil types differing in Zn bioavailability Wissuwa et al. (2008) concluded that Zn can vary more than 2-fold depending on the soil-Zn status. Similar results were reported in a study comparing 68 genotypes across 15 locations in India, where close to 2-fold variation in Zn was detected between site means and this variation could mainly be attributed to contrasting levels of plant-available Zn in the soil (Naik et al., 2020). In contrast, effects of environments tested here were minor, possibly indicating that soil-Zn availability was not a limiting factor at any of our sites. In both years variation in Zn was mostly due to G effects that accounted for 76% and 78% of the variation in 2018 and 2019, respectively. GEI effects were comparatively small contributing 23% in 2018 and 12% in 2019.

Similarly strong G effects had also been reported by Babu et al. (2020) who screened a collection of 40 landraces and released varieties in three environments and attributed 66.7% of the variation to G compared to 27.4% for GEI effects. Larger G than GEI effects were furthermore detected in screening traditional genotypes and advanced breeding lines in multilocation trials over five provinces in India (Naik et al., 2020). Contrasting to this pattern of dominant G effects, Suman et al. (2021) reported that only a very limited part of the variation for Zn was contributed to G effects (8.1%) in their evaluation of 44 RILs tested in four environments. However, GEI effects were even smaller explaining only 1.9% and that was due to the dominant E effect (89%) which was caused by testing populations in the wet and dry season; the dry season in one year increasing Zn by about 50% (Suman et al., 2021).

In contrast to results for Zn, GY was much stronger affected by E and GEI effects and GGE plots indicated the presence of two mega-environments that strongly affected yield levels generally, but also in genotype-specific way with strong GEI encountered in both years. MAR1a and ANJ1 represented one mega-environment with the common feature of sufficient water supply through irrigation, which would explain the similar ranking of genotypes. Infrequent rains at the rainfed lowland ANK1 site and periodic salinity in coastal MAR1b may have contributed to a different ranking of the genotypes in the second mega-environment. For example, BF156 and BF011 were among the top 3 lines

for GY at ANK1 but their GY was below average at MAR1a. In the 2nd year the comparison of a zero-input treatment (farmer's practice) to NPK fertilizer application was included and NPK application improved GY by an average of 69% across sites. Different grouping of environments was encountered depending on NPK application. Without fertilizer, one mega environment was defined by ANK2, MAR2a and ANJ2b with IR64 the winner genotype, while with NPK application, ANK2+ was grouped with MAR2a+ and BF110 was the best performing genotype. With NPK, the ANJ2a+ became the best ranking environment with greater and more stable performance.

The significant GY enhancement under NPK at most sites was most likely due to the effect of P as Malagasy soils are typically deficient of P (Rabeharisoa et al., 2012). Negative correlation has often been reported between grain yield and grain Zn concentration (Inabangan-Asilo et al., 2019), suggesting higher yields could have led to a dilution of Zn in the larger grain biomass. However, this effect was not observed here. Furthermore, antagonistic effects between P and Zn have been reported, with high doses of P fertilizers potentially leading to an imbalanced P:Zn ratio in the soil that can reduce Zn uptake by the plant (Olsen, 1972). These effects were apparently of little importance here, possibly because the native soil-P levels are expected to be in the deficiency range (Rabeharisoa et al, 2012). Application of P as well as N and K may therefore positively affect the ability of plants to acquire Zn from the soil through improved root and plant growth.

III-5-4-Breeding Zn biofortified rice for Madagascar

Our 2-year study established that local varieties tested failed to reach Zn biofortification targets and that the recommended variety for Malagasy central highlands, X265, indeed had highest grain yields but at low Zn of $18 - 19 \ \mu g.g^{-1}$ Zn. Among the biofortified breeding lines imported from CIAT several combined Znlevels at or above short-term breeding targets with acceptable GY and were thus candidates to enter further variety testing where their poor panicle exertion prevented a release. However, based on the data generated a likely breeding strategy emerges. Local varieties with good adaptation and yield potential would have to be crossed with donors of the high Zn trait. BF109, BF110, BF156 and BF021 would be candidate donors for this purpose. Even higher Zn above 40

ppm was consistently detected in genebank accession IRIS9368, which belonged to the aus sub-group of rice that contains many other high-Znaccessions as potential donors (Rakotondramanana et al., 2022). This aus sub-group is genetically distant from the predominantly indica type rice grown in the lowlands of Madagascar. This distance may require further backcrossing.

Stable performance in grain yield and Zn is essential for the successful development and diffusion of biofortified rice (Inabangan-Asilo et al., 2021). In order to combine high Zn with good grain yield both traits need to be selected for and the difference in importance of GEI for Zn and GY poses the question how this may best be achieved. The dominant G and much smaller GEI effects for Zn indicates selection for Zn could be centralized or limited to few sites. Based on GGE biplots for Zn no distinct mega-environments emerged but several environments were grouped near the AEA and could thus be sites to conducted Zn evaluations. Correlations for Zn between 13 environments (Suppl Figure S4b) indicated ANK2+ to be a rather representative environment, having strong correlations with eight of the 12 environments and may thus be suitable as a selection site. Similarly, MAR2b was highly correlated to other environments and being located in the coastal region, would allow for selections during the off-season, thereby speeding up the variety development process. Field evaluations of the most promising advanced generations prior to variety release could then be scattered in various farmers' fields across environments in order to collect data relevant to the farmers' field management effects.

For GY two distinct mega-environments were detected and contrary to expectations, these did not distinguish highland from coastal off-season sites. Instead, higher yielding environments represented by MAR2a and to a lesser extent by ANJ2b and ANK2 were distinct from environments partly characterized by the presence of abiotic stresses such as low soil fertility, salinity or mild drought (ANJ2a, BEN2a, BEN2b and MAR2b). The early-stage evaluation of large numbers of entries for GY should thus be conducted at least at one site per mega environment. If resources are available and if breeding for adaptation to certain stresses is of importance, additional sites will be needed but to optimize this process sites should be characterized in more detail with regards to prevailing stresses.

III-6-Conclusions

Low Zn concentrations found in grains of most commonly grown local rice varieties could partly explain the high prevalence of Zn deficiency in Madagascar. Zn biofortification breeding should therefore be a priority and needs to rely on genetic resources such as the donors identified in this study. That genetic effects were consistent and 3-fold stronger compared to GEI effects facilitates breeding efforts. A concerted effort should be undertaken to further test high-Zn breeding lines developed elsewhere (Asia, Latin America) in Madagascar and other African target countries for Zn biofortification in rice. Likewise, high-Zn lines and donors identified here are likely to be high in ZN elsewhere and could therefore be shared with interested parties across Sub-Saharan Africa, not least to consider a fast-track release as first Zn-biofortified varieties in Africa if they prove to be generally adapted and of acceptable plant and grain type.

PARTIE 4 : Le zinc dans la plante et son accumulation dans

les grains de riz.

IV-1- Introduction

Le zinc (Zn) est un micronutriment essentiel pour tous les organismes (White and Broadley, 2011). Il est requis comme cofacteur dans plus de 300 enzymes et joue un rôle essentiel dans de nombreuses protéines. Sa carence entraîne des dommages importants chez les plantes et les humains (Solomones, 2009). Le recours à des régimes à base de céréales peut induire des problèmes de santé liés à une carence en Zn chez l'homme, tels que des troubles du développement physique, du système immunitaire et des fonctions cérébrales (Cakmak et al, 2008). On estime qu'environ un cinquième de la population mondiale est à risque d'apport insuffisant en zinc (Willis et al, 2005). Le riz (*Oryza sativa L*.) est l'aliment de base dominant pour plus de la moitié de la population mondiale (Zimmernann et al, 2002), mais présente une mauvaise source de micronutriments essentiels tels que Fe et Zn. Plusieurs stratégies ont été suggérées pour améliorer les concentrations de Zn dans les grains, parmi lesquelles la sélection végétale relative à la biofortification génétique semble être la plus durable et la plus rentable (Cakmak et al, 2008).

L'enrichissement de la concentration en Zn du riz de 30 mg kg⁻¹ fixé par le programme HarvestPlus fournirait 40 % des besoins moyens estimés pour les enfants de moins de 5ans, les femmes enceintes et allaitantes (Saltzman et al., 2013). Atteindre la concentration cible de Zn dans les grains peut être particulièrement difficile. Par conséquent, il est crucial de comprendre l'absorption, la translocation et le transfert de Zn dans les grains de riz par la plante, car cela influence non seulement la teneur en zinc dans les grains, mais également la capacité d'une plante à pousser et à produire dans un sol pauvre en Zn. L'efficience en Zn d'une variété de riz est connue pour être influencée par plusieurs processus liés aux racines et aux biomasses, tels qu'une absorption plus élevée de Zn par les racines, une translocation élevée de Zn de la racine à la biomasse, l'utilisation biochimique de Zn, la compartimentation sous-cellulaire et la translocation accrue du Zn des vieux tissus végétaux vers les nouveaux (Hacisalihoglu et Kochian, 2003 ; Impa et Johnson Beebout, 2012). L'efficacité de chacun de ces mécanismes est susceptible de varier en fonction de l'environnement du sol et de la variété (Impa et Johnson-Beebout, 2012). Des études ciblées sur la (ré-)allocation, allant au-delà des analyses de balance de masse, ont été menées dans le riz en utilisant du zinc marqué, soit radio-actif (Jiang et al., 2007) soit stable (Wu et al., 2010). Jiang et al. (2007) ont découvert que la majeure partie du Zn absorbé par les racines après la floraison s'accumulait dans les grains alors que seule une petite partie du Zn appliqué sur les feuilles était réaffectée des feuilles aux grains. Les travaux récents de Mabesa et al. (2013) semble faire allusion à des résultats semblables, bien qu'il puisse y avoir une variation génétique qui mérite d'être poursuivie. Ces données ne fournissent pas d'informations sur la contribution de la réaffectation à partir des feuilles de Zn qui avait été absorbé par les racines à différents stades. L'étude de Wu et al. (2010) fournissent des informations précieuses sur la manière dont le Zn récemment absorbé est alloué puis réalloué à différents stades de croissance. Cependant, ces données ne fournissent pas d'informations sur la réallocation à long terme du Zn absorbé pendant le stade végétatif ou pendant la formation de la panicule ou de remplissage des grains après la floraison (Stomph et al, 2009). De plus toutes ces études se sont faites dans des solutions hydroponiques dans des laboratoires ne mimant pas les conditions réelles aux champs.

L'objectif de cette étude est d'identifier dans des conditions réelles de cultures les facteurs physiologiques déterminant la variabilité des teneurs en zinc des variétés ayant différents taux de zinc dans les grains. Les objectifs spécifiques y afférents sont de (i) déterminer les stratégies physiologiques influençant le passage du zinc du sol a la biomasse pendant les stades d'épiaison et de maturité (ii) étudier les modes de remplissage de Zinc dans les grains riz (iii) identifier les facteurs déterminant les remplissages du zinc dans les grains. En lien avec ces objectifs, les hypothèses suivantes ont été testées.

(H1) Les variétés à haute teneur en zinc dans les grains adoptent à la fois une absorption directe de Zn du sol et une réallocation de Zn des biomasses durant la phase de remplissage des grains les différenciant ainsi des variétés à faible teneur en zinc adoptant seulement une de ces stratégies.

(H2) Le transfert de zinc dans les grains se font progressivement en corrélation positive avec le zinc dans la biomasse.

(H3) La teneur a maturité en zinc dans les grains de riz dépend la concentration initiale de zinc au début du remplissage de grain.

IV-2- Matériels et méthodes

IV-2-1- Dispositifs expérimentaux

L'étude a été menée dans des rizières des producteurs locaux sur 2 sites a Behenjy (19°20'74"S, 47°48'20"E) et Anjiro (18°89'99"S, 47°97'46"E) qui diffèrent par leur Altitudes respective de 1418 m et 980 m. Les essais ont été établis dès le début de la saison de pluie du Novembre 2020 dans ces 2 sites des Hautes Terres de Madagascar. La récolte a été fait le mois de Mai 2021.

Six variétés ont été utilisées pour l'expérimentation dont 2 variétés à haute teneur en zinc dans les grains. En effet, IRIS9368 et IRIS10114 ont été identifiées à partir des 3000 variétés stockées dans la banque de gène de l'IRRI suite à une prédiction génomique sur la concentration en zinc dans les grains (Rakotondramanana, 2022). Deux autres variétés biofortifees du programme de sélection du CIAT (BF156 et BF110), IR64 utilisée comme témoin à faible teneur en zinc et X265 étant la variété locale améliorée la plus cultivées dans les sites d'intervention et présentant une teneur en zinc faible (Rakotondramanana et al, 2023).

Le design de l'expérimentation est le dispositif aléatoire complète avec trois répétitions. La superficie de chaque bloc est de 2 m2 ($2m \times 1 m$) soit 11 plants de riz pour 5 lignes avec 20 cm d'espacement entre les plants. Le repiquage est effectué 30 jours après le semis avec un traitement NPK 11 :22 :16 en raison de 300 kg/ ha et un témoin sans apport d'engrais. Aucun problème évident de gestion de l'irrigation, de mauvaises herbes ou de ravageurs n'a été observé au cours des expérimentations.

Expérimentation 1 :

Cet essai a pour objectif de faire une balance de masse des biomasses au stade d'épiaison et de maturité en vue de déterminer la quantité de zinc absorbée par la plante avant et après la formation de panicule donc des grains. Ainsi savoir la stratégie adoptée par chaque variété quant au transfert du zinc du sol aux biomasses et par la suite des biomasses dans les grains est essentiel. L'absorption directe de zinc venant du sol est-elle plus favorisée par les plantes aux détriments des remobilisations du zinc des biomasses durant le remplissage des grains ? Et dans quelles conditions ces deux stratégies peuvent être additionnelles ou sélectives.

Pour cela un échantillonnage de plantes de riz avant et après la formation de panicules, c'est-à-dire durant l'épiaison et la récolte a été effectué.

Pour déterminer la concentration de zinc (Zn) et la teneur en zinc (TZn) dans la plante et les grains, des plantes entières de riz incluant la biomasse et les grains ont été échantillonnées. Pour éviter la contamination des échantillons à analyser par les eaux et les sols issus des rizières, les plantes de riz ont été coupées en raison de 20 cm au-dessus des parties immergées dans l'eaux d'irrigation. Les pailles restants ont également été collectées pour le poids sec. Une balance des poids de la biomasse collectée durant les deux stades d'échantillonnages est nécessaire étant donné que les mêmes plantes ne peuvent pas être échantillonnées deux fois de suite. En effet, deux plantes identiques durant un stade bien déterminé devraient être sélectionnées. Pour cela, la plante à échantillonner durant le stade de maturité a été marquée durant le stade d'épiaison. Ainsi, une plante avec une biomasse et un stade identique à celle échantillonnée durant l'épiaison a été sélectionnée. Les panicules et la paille des échantillons ont été séparées et séchées au laboratoire (séchage à l'air libre) pendant 3 jours. Elles sont ensuite pesées pour avoir les poids secs de la biomasse et des grains. Les échantillons de plantes ont été broyés avec un broyeur en acier inoxydable et ont été envoyés au Japon pour une analyse de la concentration en zinc à l'aide de l'ICP.

Expérimentation 2:

Cette deuxième étude consiste à suivre le transfert du zinc dans les grains par échantillonnages des grains de paddy tout au long du stade de remplissage de graine. Sur le même essai que l'expérimentation 1, des échantillons de 10 panicules ont été prélevées a 4 ,8 ,12 ,20 , 24 et 28 jours après floraison. Les panicules sont prélevées sur les plantes qui ne sont pas utilisées pour l'expérimentation 1. Les panicules sont soigneusement

coupées et mises dans des enveloppes en papier, séchées dans l'étuve a 50oC pendant 3 jours avant d'être envoyé en Australie pour une analyse de zinc au ICP.

IV-2-2- Calculs et analyse statistique

Le terme « biomasse » fait référence à toutes les parties aériennes des plants de riz sans les panicules. Les formules utilisées pour les calculs sont les suivantes.

Concentration en Zinc= valeur directe issue de l'analyse par ICP

Teneur en zinc de la Biomasse /les grains = concentration de Zn dans la Biomasse /les grains \times son poids sec.

Absorption de Zn = Teneur en Zn de la biomasse à maturité – Teneur en Zn de la biomasse a l'épiaison.

Transfert du zinc = Teneur en zinc dans les grains / absorption de Zn.

Indice de récolte de zinc (ZnHI) = Teneur en Zn du grain/ Teneur en Zn de la biomasse à maturité

Pour tester les différences statistiques entre deux sites, des traitements utilisés ainsi qu'entre les variétés, en termes de concentration en Zinc et de la teneur en zinc, l'analyse de variance de type III avec la méthode de Sat terthwaite a été utilisée. La fonction ANOVA dans le lmerTest du package lme4 du logiciel R a été utilisée (Kuetsova et al. 2017). Pour l'expérimentation 2, les mêmes analyses statistiques ont été établies en ajoutant le facteur'' jours après semis'' dans la comparaison des moyennes.

IV-3- Résultats

IV-3-1- Zinc dans la plante

La concentration de zinc dans la biomasse à l'épiaison et au stade de maturité varient significativement en fonction des variétés (Tableau 9). IRIS9368, IRIS10114 et BF110 ont une teneur élevée en zinc dans la biomasse au stade de l'épiaison avec des valeurs

respectives de 39.83 à 33.15 ug/g. Alors que IR64, X265 et BF156 ont une faible concentration en zinc avant l'épiaison avec des valeurs respectives de 26.55, à 27.00 ug/g.

Tableau 9 : Comparaison des moyennes avec des groupement issues du Test de Tukey entre les concentrations en zinc de la biomasse et des grains a maturité des 6 variétés étudiées durant la stade d'épiaison et de récolte.

	Epi	aison**	*	Recolte***						
ID	Shoot-Zn	SD	.groupe	Straw-Zn	SD	.groupe	Grain-Zn	SD	.groupe	
IRIS9368	39.83	4.2	а	54.83	10.3	а	34.17	2.79	а	
IRIS10114	36.50	3.4	ab	54.67	3.5	а	29.83	1.72	b	
BF110	33.15	5.1	b	39.94	5.3	bc	30.22	1.79	ab	
BF156	26.55	1.6	С	33.54	7.0	bc	24.48	3.51	С	
IR64	26.95	1.1	С	29.74	5.0	С	22.28	1.30	С	
X265	27.00	2.3	С	43.83	6.2	ab	18.00	1.55	d	

*** Signif. Codes avec FValue 1.04E-1 significative a <0.001.

La concentration en zinc de la biomasse du IR64 n'a augmenté que de 10 % entre l'épiaison et la fin de la phase de maturité alors que celle de X265 et IRIS10114 ont respectivement augmenté de 62% et 50%. Tandis que les génotypes BF110, BF156 et IRIS9368 ont une augmentation entre 20 et 38 % par rapport à leur stade épiaison. La Teneur en zinc élevée dans la biomasse au stade de maturité pour toutes les variétés suppose une absorption continue de zinc du sol par les racines jusqu'à la récolte.

La figure 14 montre que la concentration et la teneur en zinc dans la biomasse (feuilles, tiges) sont plus élevé comparées à ceux des grains. Au stade d'épiaison, les teneurs en zinc de BF110 et IRIS10114 sont significativement plus élevées par rapport aux autres génotypes avec des valeurs moyennes de 838,98 µg et 871,33 µg respectivement. La variété IRIS9863 a montré une teneur en zinc plus faible avec une valeur de 374,17 µg (figure 14). Cela signifie que BF110 et IRIS10114 Absorbent une grande quantité de zinc avant l'épiaison c'est-à-dire durant le stade végétatif. Cette absorption est en corrélation positive avec l'augmentation de la biomasse. Pour IRIS9863, le génotype absorbe beaucoup de zinc étant donné que la concentration en zinc est élevé mais la formation de biomasse est très limitée. En effet, le poids moyen de la biomasse incluant les feuilles et les tiges des variétés BF110, BF156, 10114, IR64 et X265 pendant l'épiaison varie de

 $20,26 \pm 3,7$ g à $25,1 \pm 4,5$ g et ne présentent pas de variation significative, à l'exception de IRIS9368 (figure 14). IRIS9368 présente les plus faibles valeurs de biomasse tant au stade d'épiaison que durant la récolte avec des valeurs respectives de 9,38±1,9 g et 8,2±2,3 g. La variété locale améliorée X265 présente la plus forte biomasse avec une valeur moyenne de 12,6 g (**Figure 14**).

La concentration en zinc dans les grains varient significativement en fonction des variétés. IRIS10114 et IRIS9863 ont une concentration en Zn élevées tandis que X265 et IR64 ont les concentrations les plus faibles. Cependant, le poids des grains de 9863 est le plus faible tandis que celui de X265 est le plus élevée. Ainsi, la teneur en zinc dans le grain de IRIS9863 est le plus faible. Alors que celui de IRIS10114 demeure le plus élevée parce que sa concentration en zinc et le poids des grains sont en corrélation positive (R=0.65) (Annexe 10).

Т

BF110

BF156 BHWt

0.00





X265 SMWt

IR64 ∎ GMZn

IRIS10114

IRIS9863

77

ID	Absorption(ug/g)		Transfer		Indice de Recolte (HI)		Indice de recolte en Zn (Zn-HI)	
BF110	405.67	bc	0.56	abc	23.75	C	19.17	С
BF156	444.24	bc	0.5	bc	29.78	BC	23.88	abc
IRIS10114	846.5	а	0.43	С	33.17	Ab	21.3	abc
IRIS9368	239.66	с	0.79	ab	37.27	A	27.28	а
IR64	313.24	bc	0.87	а	32.5	Ab	26.56	ab
X265	596.33	ab	0.39	С	37.43	A	19.95	bc

L'absorption en zinc qui se traduit par la différence de la teneur en Zn de la biomasse à maturité et la teneur en Zn de la biomasse a l'épiaison des variétés IRIS10114 et X265 sont significativement élevées par rapport aux autres variétés avec des valeurs allant de 665 à 1062µg durant le stade de remplissage de grains. Cela nous montre que pour ces deux variétés l'absorption de zinc est abondante continue durant toute le cycle de la plante de riz au niveau des biomasses. IRIS9368 a la plus faible valeur est en termes d'absorption avec une valeur moyenne de 239 µg durant le stade reproductif. Cependant, la majeure partie du zinc de la biomasse de IRIS9368 et IR64 est transloquée vers les grains soient respectivement 79% et 87% (tableau 9). Alors qu'avec une valeur de coefficient de transfert de 0.39, X265 a une grande quantité de zinc dans les feuilles et les tiges mais n'est pas transférée dans les grains. Le riz biofortifié (BF110 et BF156) ont des valeurs d'absorption de zinc modérée entre 405 et 596 avec environ 50 à 56 % des zinc absorbées ont été transférés aux grains. Le tableau 9 montre aussi qu'une variation significative entre les variétés a été observée en termes d'indice de récolte relatif au poids des grains (HI) dont X265 et IRIS9368 présentent des valeurs élevées (HI=37). Les résultats ont révélé qu'une augmentation de HI n'est pas associée à une augmentation de

Zn-HI dans les grains. En effet, IRIS9368 et X265 ont un HI élevé. Cela nous montre que

ces variétés transforment une grande partie des éléments absorbées et se trouvant dans les

IV-3-2-Absorption et translocation pendant le remplissage du grain Tableau 9: Teneur de Zinc absorbée par la plante tout au long du stade de remplissage de grains, le coefficient de zinc transféré dans le grain ainsi que les indices de récoltes relatives au poids des grains et de la teneur en zinc transmis dans les grains. Les groupements sont obtenues suite au test de Tukey avec un taux de signifidcation <0.001.

biomasses en grains. Cependant X265 a une faible Zn-HI avec une valeur moyenne de 19,95, alors que celui de la variété IRIS9368 est élevé (27,28). L'analyse statistique a également montré une différence significative de Zn-HI entre les variétés. Le Zn-HI varie de 14,7 à 37,6 avec une moyenne de 23 avec un ordre décroissant de IRIS9368 suivis de IR64, BF156, IRIS10114, X265 et BF110 (**Tableau 9**). Le transfert de zinc des parties végétatives aux grains de IRIS9368 et IR64 sont plus fluide. Tandis que pour X265, la cause de la concentration et teneur en zinc faible dans les grains se situe au niveau de la translocation et/ou le chargement de zinc dans le grain lors du remplissage du grain. IRIS10114 a le plus faible indice de transfert (0.43), toutefois la concentration de zinc dans le grain est élevé (29.8 μ g.g⁻¹).

IV-3-3-Chargement de zinc dans les graines durant le remplissage de grains

L'analyse de la Variance (Tableau 10) montre que la concentration en zinc dans la graine dépend principalement dans les 2 premières semaines après floraison des variétés utilisées. Ces résultats montrent que chaque variété présente des aptitudes différentes dès le début du remplissage de grain quant à l'accumulation de zinc dans les grains. Alors qu'à partir de 20 jours après floraison, la concentration en zinc dans la graine de riz dépend significativement de la variété et du site. Cela signifie qu'après 20jours, le remplissage dépend une partie de l'environnement dans lequel la variété est cultivée. L'apport de NPK n'a pas d'effet significative sur la concentration en zinc.

Le poids de 1000 grains quant à lui dépend significativement à la fois de la variété et du l'environnement dès le début de remplissage des grains jusqu' a 12 jours après floraison

(Tableau10). Durant les deux premières semaines de remplissage des grains, l'apport

d'engrais n'a aucun effet sur le poids des grains. A partir de 20 DAF jusqu'à la récolte, chaque facteur (Variété, Site et Traitement NPK) influence significativement sur le poids du grain.

Tableau 10:Analyse de la variance (ANOVA) de la concentration en zinc (Zn), du poids de
1000grains (1000WT) et de la teneur en Zinc (ZnCont) de 6 variétés de riz en fonction des
sites d'intervention (Anjiro et Behenjy). Sous traitements NPK et sans apport de
fertilisation pour différents temps de prélèvement (Jour après Floraison DAF).

			DAF4	DAF8	DAF12	DAF20	DAF24	DAF28
		NumDF	MeanSq	MeanSq	MeanSq	MeanSq	MeanSq	MeanSq
Zinc	ID	5	536.48 ***	479.13 ***	504.12 ***	588.74 ***	520.31 ***	642.7 ***
	Site	1	6.03	36.73	3.98	148.88 ***	370.47	240.01 ***
	TRT	1	22.47	167.31 **	1.59	10.92	27.17	6.62
1000WT	ID	5	8.16 ***	21.15 **	58.71 ***	49.36 ***	59.041 ***	46.829 ***
	Site	1	15.58 ***	48.66 **	222.47 ***	24.94 **	16.291 ***	27.663 ***
	TRT	1	0.035	3.59	0.76	36.81 ***	12.011 *	8.932 *
Content	ID	5	3682	68953 ***	144472 ***	221865 ***	233145 ***	307006 ***
	Site	1	21928.5 ***	107981***	289796 ***	146310 ***	231547 ***	201054 ***
	TRT	1	24.1	2595	9229	52155 **	41989 ***	24085 **

La teneur en zinc des deux premières semaines après floraison est significativement affectée par les variétés et le site donc l'environnement dans lequel le riz est cultivé. Et à partir du 20 DAF, elle est significativement influencée par les 3 facteurs : le génotype, le traitement NPK et le site. La teneur en zinc dépend du poids de 1000 grains et suivent sa tendance en tant que facteur expliquant.

Dès le début du remplissage des grains, les concentrations en zinc des grains de toutes les variétés étudiées sont élevées par rapport aux concentrations a la récolte dans les deux sites Anjiro et Behenjy (**Figure 15**). La variété IRIS9368 présente la valeur la plus élevée en zinc dans les grains alors que X265 a la plus faible valeur pour les deux sites. La concentration en zinc des variétés biofortifiées BF110 et BF156 dépendent de l'environnement, c'est-à-dire que leurs valeurs varient en fonction du site. Les

concentrations en zinc diminuent au fur et à mesure du remplissage des grains. La concentration en zinc de IRIS9368 est toujours significativement supérieure aux autres variétés. Alors que celles de IR64 et X265 sont toujours les plus faibles.



Figure 15: Concentration en Zinc, poids de 100 grains et teneur en zinc de 6 génotypes en fonction des dates d'échantillonnages (jours après floraison) dans 2 sites d'intervention (Anjiro et Ankazo).

Contrairement à la concentration en zinc, le poids des grains augmente au fur et à mesure que les graines se remplissent (Figure 15). Cela suppose que le transfert de zinc dans la graine se fait principalement dès le début du remplissage des grains et le zinc se dilue au fur et à mesure que la graine se remplisse par d'autres éléments constituants. Le poids du grain de IRIS10114 est supérieur par rapport à ceux des autres variétés avec une valeur de 31g. Les autres variétés ne présentent pas de différences significatives quant aux poids des grains. La teneur en zinc issus du produit du poids et de la concentration en zinc, augmente au fur et à mesure du remplissage de grains. Les variétés IRIS ont une teneur en zinc significativement élevée par rapport aux autres variétés. IRIS9368 est le plus performante en termes de teneur en zinc a Anjiro tandis que IRIS10114 a Behenjy. Pendant la récolte la teneur en zinc de ces deux IRIS n'a pas de différence significative. **La figure 15** montre que pour les variétés de riz biofortifiees, le poids de 1000 grains ainsi que la teneur en zinc dépendent du site, les valeurs varient en fonction de l'environnement.

La teneur en zinc dans le grain dépend des variétés (**figure 16**). Le maximum d'activité de transfert de zinc dans les grains de IRIS10114 et IRIS9368 dont plus de 50 % se produisent avant 15 jours après floraison pour les deux sites d'intervention. Pour BF110 et BF156 cela dépend du site : pour Anjiro, moins de 50% du zinc est transfère, durant les 2 premières semaines après floraison alors qu'à Behenjy, le maximum d'activités de transfert se fait durant 12-20 jours après floraison. Pour Behenjy, le transfert de zinc est en corrélation positive avec l'augmentation du poids de grains pendant le remplissage des grains (**figure 16**).

Pour X265 dans les deux sites, 30% du zinc est transfère au niveau du grain durant 4-12 jours après floraison. 50% du zinc est transfère dans les grains durant les 12-20 jours après floraison. Pour IR64, le transfert est bien reparti tout au long du remplissage de grain dont 40% de la teneur en zinc dans la graine durant la dernière phase de maturité (**figure 16**).

Pour le remplissage de grains par les autres constituants excluant est influencée par l'interaction de variétés et de l'environnement. Pour Anjiro et toutes les variétés utilisées, environ 70-80% des constituants sont transférés dans la graine entre 12-20 jours après floraison. Alors que pour Behenjy, le maximum de transfert se fait durant les 15 jours après la floraison (**figure 16**).



Figure 16 : Pourcentage des Remplissages des grains et de la teneur en zinc de 6 génotypes à un intervalle de 4 à 12, 12 à 20 et de 20 à 28 jours après floraison. Ces valeurs utilisées pour les pourcentages sont la différence des valeurs de la teneur en zinc et du poids de chaque échantillon par répétition sur ces points d'échantillonnages. Les valeurs obtenues sont par la suite traitées statistiquement pour avoir les moyennes, valeurs utilisées dans ces graphes.

IV-4-Discussion

IV-4-1-L'absorption de zinc du sol a la biomasse aérienne

La teneur en zinc de la plante à maturité a augmenté par rapport à celle de l'épiaison dans la plupart des cas, indiquant une absorption continue de Zn du sol pendant la période de remplissage des grains (**figure 14**). Ces mouvements nets de Zn dans la plante nous indiquent que les sols des sites d'expérimentation d'Anjiro et de Behenjy présentent une quantité suffisante de zinc disponible, c'est à dire que les sols des sites d'expérimentations ne sont pas déficients en zinc. En effet, la teneur en zinc dans les grains et les parties végétatives de la plante dépendent en grande partie de l'état et zinc dans le sol (Wissuwa, 2006) et du potentiel redox (Impa et al, 2013). Plus le zinc est en abondance dans le sol, plus la plante de riz en absorbe. Aussi, la succession de drainage et d'irrigation des rizières libère les molécules de Zinc qui sont facilement absorbable par la plante. Durant les contres saisons, les champs des hautes terres de Madagascar sont souvent sujets de drainage pour des cultures sèches relâchant ainsi les zincs absorbables par les plantes.

La teneur et la concentration en zinc élevées dans les biomasses supposent que l'absorption de zinc du sol – racine ainsi que le transfert racine - biomasse ne sont pas des barrières pour le zinc (**Tableau 9**). Ce qui n'est pas le cas pour beaucoup d'études (Stomph et al, 2009). En effet le transfert de zinc de la racine est un processus dépendant de la variété. De plus, plusieurs transporteurs impliqués dans l'amélioration de l'accumulation de Zn dans le grain du riz ont été identifiés contribuant efficacement aux transports et donc transfert de zinc sol-racine-biomasse (Sperotto et al., 2009, 2010 ; Johnson et al., 2011 ; Lee et al., 2011 ; Bashir et al., 2012). Dans des conditions ou le zinc disponible dans le sol n'est pas limitant, le zinc est directement transféré du sol vers les graines durant le stade de remplissage de grains (Impa JXB,2013) comme le démontre les résultats de cette étude. Alors que, dans des conditions de déficiences en Zn dans le sol, certaines variétés démontrent une remobilisation du Zn de la biomasse et de la racine en plus de l'absorption directe du sol (Saporroto et al, 2013).

IV-4-2-La teneur en zinc et la concentration en zinc au cours du remplissage de grain

Les variations génotypiques significative des variétés observées pour la teneur en Zn dans les grains du riz sont fortement influencées par la variation du poids des grains par variété au fur et à mesure du remplissage de grain (Figure 15). Le poids des grains et la concentration en micronutriments des grains sont souvent négativement corrélés (Mc Donald et al., 2008). Une amélioration de la croissance ou une augmentation du rendement réduit généralement la concentration d'un micronutriment même si l'absorption totale augmente (Marschner, 1995), ce qui est souvent appelé « effet de dilution ». En d'autres termes, une variété avec un indice de récolte plus élevé montrerait une concentration en Zn dans le grain plus faible comme le cas de X265 avec HI=37 et Zn=18µg/g. Cependant cela n'est pas le cas pour la plupart des variétés étudiées. En effet, le poids de grains n'affecte pas la teneur en zinc des variétés à hautes teneur en zinc sélectionnées dans cette étude. IRIS10114 a un grain plus large et plus lourd par rapport aux autres variétés, alors que sa concentration en zinc est 32.8µg/g. Par conséquent, lors du criblage des variétés avec un taux élevé en zinc dans les grains, il est possible de sélectionner les variétés qui ont a la fois une capacité inhérente à une accumulation accrue de Zn dans le grain, un poids de 1000 grains et un rendement élevés, comme la variété IRIS6398 qui a une HI=37 mais avec un Zn élevé soit 40.33ug/g.

IV-4-3-Les stratégies d'absorption et de transfert de zinc du sol dans les plantes et les panicules dépendent des variétés.

Les variétés BF110, IRIS9368 et IRIS10114 absorbent une grande quantité du zinc pendant le stade végétatif (Tableau9). Et IRIS10114 continue l'absorption durant le stade de maturité alors que X265 en absorbe rapidement durant le stade reproductif (figure 16). Les stratégies des plantes de riz quant à l'absorption de zinc varient en fonction de la capacité de la variété à s'adaptera à la disponibilité de zinc dans le sol. (Quijano Guerta et al., 2002 ; Wissuwa et al., 2006 ; Impa et al., 2013). En effet, outre la disponibilité du Zn dans la rhizosphère, l'autre facteur qui pourrait déterminer le mode de transfert de zinc est l'activité racinaire pendant la période de remplissage du grain (Jiang et al., 2007). Plus la plante a un système racinaire développé, plus il y a absorption de microélément et transfert du zinc dans les grains.

Aussi, comme le cas de la variété IR69428, biofortifiée issue d'un programme de biofortification de l'IRRI dans les études d'Impa et al, 2013, l'absorption de zinc par X265 pourrait se faire pendant le stade végétatif mais la plupart du zinc absorbé est stocké dans les racines. En effet les études d'Impa et al, 2013 ont montrées que les isotopes ⁶⁵Zn appliqués sur la variété IR69428 sont stockés dans les racines durant le stade tallage et sont mobilisés par la suite à partir du remplissage des grains. Ce qui est le cas de IR64 (Wu et al, 2010) et qui pourrait être aussi le cas de X265.

Wu et al, (2010) affirme que le principal problème physiologique que la biofortification affronte au niveau des plantes de riz peut être la barrière racines-biomasse aérienne. Dans ces études, la variété à haute teneur en Zn IR68144 a accumulé plus de Zn dans les grains, les tiges et les feuilles, mais moins de Zn dans les racines par rapport à la variété à faible teneur en Zn IR64. Ce qui suggère que la variété à haute teneur en Zn a transporté plus de Zn des racines aux biomasses aériennes et que la capacité de chargement du xylème en zinc est la clé de l'accroissement de Zn dans les grains. De nouvelles découvertes démontrent que la translocation racine-biomasse du Zn est contrôlée par les ATPases transportant les métaux lourds (HMA). L' Efflux Transporter Of NA (ENA1) a été récemment caractérisé (Nozoye, 2019). Ces ENA1 transportent le Zn à travers la membrane plasmique des cellules vasculaires des racines dans le xylème pour le transport vers la biomasse. Ainsi, pour augmenter les taux de remobilisation du Zn des racines aux biomasses aériennes, à des fins de biofortification, l'augmentation de l'expression de HMA4, ENA1 ou de gènes similaires peut être essentielle.

IRIS9368 ont des indices de récolte en Zn (Zn-HI) élevées par rapport aux autres variétés (Tableau9). Cela nous montre que le transfert de Zinc dans les grains est plus fluide dans cette variété par rapport aux autres. IRIS9368 a un Zn-HI et un HI élevés qui se traduisent par le transfert de la plupart du zinc de la biomasse vers les grains. La remobilisation du zinc de la biomasse aux grains se traduit chez la plante par la senescence rapide des organes sources (feuilles paniculaires, tiges, feuilles, racines), (Bukovac and Wittwer, 1957; Kochian, 1991; Sperotto et al., 2009; Impa et al., 2013). Les variétés ayant une capacité de remobilisation élevée bénéficient d'une capacite plus élevée à transférer le Zn dans le grain. Les variétés qui ont mûri tardivement montrent une absorption racinaire continue comme source prédominante de charge en Zn du grain comme les variétés IR64

et IRIS10114, alors que, chez IRIS9368 qui a mûri plus tôt, une remobilisation nette du Zn à partir de la biomasse et de la racine est prédominante (Impa, JXB, 2013).

IV-4-4-Le transfert de zinc dans les grains se fait en grande partie dès le début du remplissage des grains.

Les résultats de cette présente étude concordent avec les résultats de Stomph et al (2014) qui ont aussi trouvés des valeurs de concentration en zinc élevé dès le début du remplissage des grains soit environ 40 μ g.g⁻¹. La concentration totale en Zn des grains des variétés étudiées a chuté entre 7 et 14 jours après floraison et est resté plus ou moins constant pendant le temps restant de la période de remplissage du grain validant les résultats trouvés dans notre étude (**Figure 15**).

Dans leur étude sur le remplissage en zinc des graines, Zhang et al. (2007) décrivent trois phases clés : la division cellulaire immédiatement après la pollinisation ; expansion cellulaire après division cellulaire ; et une phase de stockage. Notamment, les principaux flux de nutriments dans les graines commencent pendant la phase d'expansion cellulaire (Zhang et al., 2007). Cependant, des différences notables se remarques entre le chargement des nutriments dans les grains. En effet, le transfert de P dans les grains est exponentiel à partir de la phase d'expansion (Wang et al, 2015) alors que celui du zinc dans les grains se fait de manière décroissante. Cette présente étude montre que la concentration en zinc dans le grain est au maximum dès le début du remplissage de grain. Des études de (Ogawa et al., 1979) montre une accumulation rapide de P entre 8-16 jour après floraison de manière exponentiel qui s'accompagne de la division cellulaire des formations de carbones. La figure 16 montre des stratégies différentes quant au remplissage des grains en zinc par les variétés étudiées. 50% du taux de zinc dans IRIS10114 et IRIS9368 se font dans les 15 jours après floraison. Alors que pour X265, 30% du zinc est chargé durant ces 2 premières semaines après floraison. Le remplissage des grains en zinc pour IR64 est reparti durant tout le stade de remplissage de grain. D'après Seporreto et al. 2013, des résultats contrastés peuvent être dus au fait que différentes variétés de riz se comportent différemment. Ainsi, il se peut qu'il n'y ait pas qu'une seule façon pour le riz de transférer le Zn dans le grain, mais des variations spécifiques aux variétés.

IV-5-5-La barrière de l'augmentation de la concentration en zinc dans X265 se remarque au niveau du transfert de zinc dans le grain.

Le transfert et la biodisponibilité des minéraux dans les grains de riz ne suivent pas seulement la voie de transport (dépendant des transporteurs) et de remobilisation (Transpiration et les vaisseaux). Cela dépend également du mécanisme d'entrée du zinc de la couche d'aleurone du grain à l'endosperme interne. Plusieurs barrières de transfert de Zn ont été identifiées, principalement des niveaux élevés d'acide phytique (Stangoulis et Knez, 2022), qui est un puissant inhibiteur de l'absorption du Zn (également appelé facteur anti-nutriment). L'acide phytique se localise presque exclusivement dans le son du riz (Liang et al., 2008), agissant comme une barrière à l'internalisation dans l'endosperme.

En condition de disponibilité de zinc dans le sol et lors du remplissage du grain de riz, la remobilisation du Zn à partir des feuilles n'est pas aussi importante que l'absorption de Zn par les racines (Jiang et al., 2007). Cependant, une absorption accrue de zinc par les racines n'entraîne pas nécessairement une accumulation accrue de Zn dans les grains de riz (Jiang et al., 2008). En plus, aucun des applications d'engrais foliaire de Zn dans le riz n'a montré que la majeure partie du Zn transféré dans le grain était remobilisée à partir des feuilles (Jiang et al., 2008 ; Stomph et al., 2009). Wu et al. (2010) ont montré que de grandes quantités de Zn dans les graines de riz à maturité avaient été retransloquées à partir d'autres parties de la plante et non directement acquises par les racines. Récemment, Yoneyama et al. (2010) ont rapporté que le Zn dans les grains de riz peut être activement fourni via le phloème après mobilisation à partir des limbes des feuilles et surtout des nœuds et de la tige.

Dans cette étude, la différence entre les concentrations en zinc dès le début du remplissage de grains est significative entre les variétés avec des valeurs élevées comparées à la récolte (**Figure 15**). Cela est probablement due à la longueur du processus de remobilisation qui se traduit par la mobilité du zinc dans le phloème après transport dans le Xylème avant d'entrer dans le grain (Stomph et al., 2009). En effet, le zinc est transporté par le xylème des racines vers la biomasse suivant le flux de transpiration, alors que le transport du phloème des vieilles aux nouvelles feuilles est plus sélectif et dépend
largement de la mobilité de chaque élément. En ce qui concerne leur mobilité dans le phloème, les Zn sont considérés comme intermédiairement mobiles. Cette Mobilité du zinc peut dépendre aussi de chaque variété (Fernández et Brown, 2013). Chaque étape du processus de remobilisation peut être une barrière potentielle au transfert de zinc dans les grains.

IV-5-Conclusion

Cette étude a été effectuée dans des conditions où la disponibilité de zinc dans le sol n'est pas un élément limitant. Les concentrations en zinc dans les biomasses aériennes sont très élevées et ces valeurs augmentent après la floraison. Les résultats de cette étude joignent ainsi les résultats précédents de plusieurs études stipulant qu'une absorption continue du zinc dans le sol même après floraison contribue le plus au remplissage en Zn des grains. Cependant une remobilisation du zinc dans les biomasses de la variété IRIS9368 peut être envisagée du fait de sa sénescence rapide et sa HI-Zn élevée par rapport aux autres variétés validant partiellement l'hypothèse 1. Les résultats de cette étude ont aussi bien montré que la variabilité génotypique des variétés se voient toujours tant au niveau de l'absorption de zinc avant la floraison que sur les transferts du zinc dans les grains durant le stade reproductif. Les stratégies adoptées par les plantes sont cependant à définir. Cette variabilité génotypique se situe soit au niveau de l'absorption elle-même mettant en jeu soit les variabilités des systèmes racinaire des variétés étudiées, soit dans la capacité de chaque variété à stocker le zinc dans les racines. Aussi, le transfert de zinc dans les grains ne dépend pas de la concentration en zinc dans la biomasse. Ces résultats ouvrent des perspectives d'études approfondies relatives aux barrières qui y résident réfutant ainsi l'hypothèse 2 stipulant que la teneur en zinc dans les grains est en corrélation positive avec celle de la biomasse.Ces futures études devraient se focaliser sur les transporteurs déjà transcrit comme ENA1 et les barrières nutritives comme le passage du zinc par l'aleurone et la présence d'acide phytique dans les sons, la couche d'aleurone et l'endosperme du riz. De plus, les performances de chaque variété ont été déterminées dès le début du remplissage de grains validant ainsi l'hypothèse 3. Comprendre ces mécanismes de transfert du Zn dans les grains de riz est crucial pour une sélection ciblée des donneurs et également pour établir des stratégies de gestion des engrais et d'irrigation afin d'obtenir des grains de riz riches en Zn.

PARTIE 5 : Discussion et conclusion générales

V-1 Discussion générale

Le riz est l'aliment de base de plus 2/3 de la population mondiale. C'est l'une des céréales la plus consommée dans le monde. A Madagascar, l'alimentation ne peut pas se séparée du riz. En plus des surfaces agricoles allouées à la riziculture partout à Madagascar, la production locale ne suffit pas à nourrir une population croissante. Cependant, des problèmes de quantité lies à la faible production se remarquent, les problèmes de qualités en vont de pair. Un enfant sur deux souffre de malnutrition aiguë dont les causes sont les plus souvent un déséquilibre alimentaire liée à une consommation exclusive de cette céréale : le riz. Les habitudes alimentaires des malagasys en font que la consommation de riz surpasse la moyenne avec 118-138 kg/personne/an (FAOSTAT,2020).

Aussi, suite à des études préalables menée par HarvestPlus sur les besoins et les consommations des populations consommateurs de céréales, Madagascar a été classe 13^{em} dans le Monde et 3^{em} en Afrique nécessitant une biofortification en zinc du riz (HarvestPlus,2013). D'après les études effectuées par HarvestPlus, une augmentation d'environ 12% des taux de zinc dans les grains de riz suffiront à mettre à niveau les besoins en nutriment des populations consommateurs,

Des lors, diverses méthodes ont été offertes pour pallier ce manque de zinc dans l'alimentation en l'occurrence l'apport extérieur de zinc (fortifications), l'apport d'engrais et enfin l'amélioration des plantes qui se voient comme le moyen le plus durable et non couteux pour l'augmentation de zinc dans les grains (PAM,2023). En effet, la biofortification fait référence à l'utilisation de l'amélioration des plantes pour augmenter la concentration et la teneur des nutriments dans les parties consommables des cultures surtout les céréales. L'objectif principale de cette thèse est de mettre en place un programme de sélection variétale de riz de bas-fond basé sur la biofortification en zinc des grains de riz. Pour ce faire, cette thèse s'est appuyée sur trois hypothèses distinctes, donc à trois types d'études moyennant des différentes expérimentations et analyses. Les résultats issus de chacun de ces études servent à atteindre notre objectif et valider les hypothèses.

V-1-1 Sélection d'un donneur

Un programme de sélection réussit se base en premier lieux sur la disponibilité des générations de plantes utilisées pour la sélection. Pour cela, les donneurs devront être bien identifier en utilisant les méthodes les plus précis possibles. Le chapitre 2 de cette thèse s'est focalisé sur l'identification des donneurs ayant la capacite d'acquérir et de stocker du zinc dans les grains. Pour ce faire, deux expérimentations sur deux sites différents ont été établies pour une GWAS des concentrations en zinc de 253 variétés issues de la banque de gènes de l'IRRI. Aussi ces 253 variétés ont été utilisées pour mettre en place une prédiction génomique en vue de prédire les concentrations en zinc des 3000 variétés ayants déjà des données génomiques dans la banque de gènes de l'IRRI. Les résultats ont montré que la concentration en zinc dépend des espèces de riz (Grenier et al, 2015 ; Lee et al. 2018 ; Lee et al. 2018). Et que les groupements AUS suivi du Japonica ont des taux élevés en zinc comparées aux autres espèces Indica et Aromatiques. Parmi les groupements AUS un donneur potentiel a été identifié IRIS9368, ayant un cycle court d'environ 120 jours, une concentration enlevée en zinc de plus de 40 ug/g mais cela au détriment du rendement (Chapitre 3). Aussi, cette variété est très performante en termes de transfert de zinc dans les grains et présente un HI-Zn élevée par rapport aux autres variétés testées. En plus de sa capacité à absorber une quantité élevée de zinc durant le stade végétatif, elle a transmis la plupart de ses zinc absorbés dans les grains (Chapitre 4). Cependant, cette variété a un rendement faible par rapport à la variété locale améliorée X265 et ses performances phénotypiques ne sont pas satisfaisant (Chapitre 3). Ainsi, cette variété peut servir de donneur pour X265 pour avoir une génération de plantes plus performantes en termes de concentration en zinc et rendement.

Aussi, plusieurs QTNs associés ont été identifiés dont le plus important est localisé au niveau du Chromosomes 11, QTN_11.3 avec un allèle rare qui augmente la concentration de Zn dans les grains de 15 %. Les résultats du **chapitre 1** indiquent que la concentration en zinc est très spécifique à chaque espèce et même à chaque variété. En effet, comme le rendement, la concentration en zinc est un caractère complexe qui se traduit par l'expression de plusieurs gènes interagissant entre eux (Norton et al.,2014 et Swamy et

al. 2018). Cependant, cette variabilité existante entre les espèces et les variétés nous permet d'améliorer les performances de celles qui ont une faible teneur en zinc mais appréciées pour d'autres caractères telles que le rendement, le gout...Les croisements entre variété à haute teneur en zinc et variété appréciée en utilisant la Sélection assistée par Marqueur est donc une étape pouvant réduire les couts des expérimentations et les temps de la sélection. Aussi, les résultats de la prédiction génomique permettent la sélection des donneurs en utilisant la modélisation sur un logiciel sans passer par des analyses ICP couteuses. En effet, cette prédiction génomique est un outil précieux dans la mesure ou la sélection variétale se fait plus rapidement et exclusivement sur ordinateur.

V-1-2 La concentration en zinc est un caractère stable.

Le chapitre 3 est issu d'une expérimentation ayant pour objectif de tester plusieurs variétés du programme de sélection de de riz biofortifiées du CIAT. 24 variétés de riz en été cultivées incluant IR64 et X265. Les expérimentations ont été réparties dans 4 régions de Madagascar dont 3 sur les hautes terres et 1 dans la région Nord-Ouest. Les résultats ont montré que 76% de la variabilité de la concentration en zinc dépend des variétés, 23% dépend des environnements de cultures et l'interaction variété-environnement ne présente pas d'effet significatif (Chapitre3). Ce qui concordent avec les résultats de Huang et al., (2021) et Nguyen et al., (2023). Aussi, l'héritabilité de la concentration en zinc trouvée dans le chapitre 2 est de l'ordre de H²=0.79 contre une valeur de H²=0.40 pour le rendement. Des résultats similaires se trouvent dans les études de Virk et al. 2021.Cela signifie que 79% de la concentration en zinc est expliquées génétiquement. Alors que pour le rendement 60% est expliquée par l'environnement contre 40% seulement issue des facteurs génotypiques. Cependant, la concentration en zinc et le rendement sont deux caractères complexes expliqués par plusieurs gènes interdépendants.

Du point de vue amélioration de plante, plus un caractère ne dépend pas de l'environnement, plus il peut être facilement transmis dans les futures générations des plantes. En effet, pour mieux cerner le programme de sélection, l'identification des gènes liées à ces 76% d'héritabilité ont déjà été étudiée dans **le chapitre 2** de cette thèse.

V-1-3 X265: une variété locale améliorée avec un bon rendement mais une faible teneur en zinc dans les grains.

X265 est une variété faisant partie des espèces indica, le classant ainsi dans celles ayant une concentration en zinc faibles dans les grains avec une valeur moyenne de 19ug/g (**Chapitre 2**). X265 est la variété la plus cultivée dans les hautes terres centrales du fait de son rendement élevé soit 2-4t/ha et de son adaptation à un large spectre d'environnement. Des expérimentations multisites utilisant X265 comme témoin confirment les résultats **du chapitre 2** (**Chapitre 3-4**). Cependant, l'absorption de zinc du sol et le transfert de zinc de la racine a la biomasse ne sont pas les facteurs limitants du remplissage de zinc dans les grains (Hacisalihoglu et Kochian, 2003 ; Impa et Johnson Beebout, 2012).

V-1-4 Programme de sélection approprié pour la concentration en zinc

Puisque la base génétique de la concentration en zinc Zn est complexe avec l'implication de multiples gènes/QTN non influencés par l'environnement (**Chapitre 2**), le choix des méthodes appropriées d'amélioration variétale, des programmes de croisement, des sélections de plantes individuelles et les processus d'évaluation sur le terrain sont cruciaux pour le développement de nouvelles variétés de riz à haute teneur en Zn. L'identification du donneur IRIS9368 peut être le début d'un programme de sélection variétale de riz de bas fond spécifique pour Madagascar en termes de concentration en zinc (**Chapitre 2-3-4**).

Due à un effet de dilution faiblement perçue dans **le chapitre 2-3**, le plus grand challenge du sélectionneur qui est la création d'une variété avec une haute teneur en zinc sans réprimander le rendement est sur la bonne voie. Le donneur à haute teneur en Zn IRIS9368 peut aussi être croisé avec des variétés populaires à haut rendement comme X265 mais à faible teneur en Zn. Une sélection sera effectuée pour caractères agronomiques dans les générations ségrégantes, avec lignées fixes finales testées pour la concentration en grain Zn élevée dans les grains et le rendement dans des parcelles répétées à grande échelle. Cette méthode conventionnelle cependant prend du temps et a entraîné seulement une légère augmentation de la concentration de Zn et un potentiel de rendement modéré (Cakmak et al, 2008, Wu et al, 2014).

Cependant, un programme de sélection modifié utilisant les mêmes parents mais couplées à des suivis de l'existence du caractère par sélection assistée par marqueurs en début de ségrégation des lignées dès la génération F4 est plus efficient. Les sélections doivent tenir compte des caractères agronomiques essentiels tel que le rendement. Cette méthode peut accélérer le développement de variétés à haute teneur en Zn et le maintien simultané du potentiel lié au rendement.

Plusieurs croisements impliquant plusieurs donneurs et parents receveurs tels que les croisements à trois voies, à quatre voies, etc, rétrocroisement avec le parent donneur, croisements riches en $Zn \times riche en Zn$, impliquant des lignes de Zn avancées améliorera les niveaux de Zn et le potentiel du rendement.

Lors de la sélection pour le riz riche en Zn, une attention particulière doit être donné à la quantité des anti-nutriments dans les grains car ils influencent significativement la biodisponibilité du Zn. Le phytate est l'anti-nutriment majeur inhibant la quantité de Zn absorbée (Raboy 2001, 2009). Dans le riz, le Zn est préférentiellement stocké ensemble avec du phytate, qui est un puissant chélateur de cations divalents. Par conséquent, les sélections doivent être faites sur des lignées avancées avec une faible teneur en phytate. Des études sur l'identification des gènes responsables de l'allocation de l'acide phytique dans le riz ont été effectuées et les résultats ont montres que la concentration en zinc et la concentration en acide phytiques sont des caractères régis par des gènes indépendants (Stangoulis et al, 2023). Il est donc bien possible de faire une sélection de lignées avances à haute teneur en zinc et faible teneur en phytate.

L'approche transgénique peut être une alternative valable pour le développement de variétés biofortifiées. Elle est utilisée dans de nombreux pays pour l'augmentation des teneurs en éléments des cultures (Higuchi et al. 2001; Inoue et al. 2003). Elle s'appuie sur l'accès au pool génétique illimité pour le transfert et l'expression de gènes désirables d'une espèce végétale à une autre indépendamment de leur évolution et statut taxonomique.

Les approches transgéniques peuvent également être utilisées pour l'incorporation de gènes impliqués dans l'amélioration de la concentration en micronutriments, leur biodisponibilité et la réduction de la concentration d'antinutriments qui limitent la biodisponibilité de nutriments dans les plantes. De plus, des modifications génétiques

peuvent être ciblé pour redistribuer les micronutriments entre les tissus, améliorer la concentration en micronutriments dans les parties comestibles des cultures (Mageto et al. 2020, Velu et al. 2016). Cependant Le développement de cultures transgéniquement biofortifiées implique initialement beaucoup de temps, d'efforts et d'investissements pendant la phase de recherche et développement. Cette production d'OGM doit être obligatoirement précédée de l'identification précis des gènes d'intérêts qui régis les processus de transfert et des modes de remplissages de grains, de nos jours encore méconnus. Mais à long terme, c'est une approche est rentable et durable. De plus, le génie génétique n'a pas de contraintes taxonomiques et même des gènes synthétiques peuvent être construits et utilisés (Cu et al. 2021).

V-2-Conclusion Générale

Les principaux résultats de cette étude montrent l'identification d'un donneur, IRIS9368 du groupement AUS avec des concentrations en zinc moyenne de 38.8 ug/g (**Chapitre 4**), 41.7 ug/g (**Chapitre 3**) et 40 ug/g (**Chapitre 2**). Aussi, les variétés BF156 et BF110 issues des programmes de sélections de CIAT ont des concentrations en zinc élevées couplées avec des rendements élevés. Cependant, ces variétés ont un problème de faible exertion paniculaire. Ce caractère peut être supprimé par des croisements successifs. Ces donneurs identifiés peuvent ainsi servir de démarrage au programme d'amélioration de plante axée sur Biofortification en zinc à Madagascar. L'hypothèse 1 est ainsi confirmée.

H1 : Les donneurs sélectionnés ont une concentration en zinc supérieure à 30mgkg⁻¹ et vont ainsi servir d'amont au programme de recherche variétale de biofortification en Zinc à Madagascar.

Les résultats des **chapitre 2-3-4** ont montré que la concentration en zinc est un caractère complexe mais stables au long des années et des différents sites d'expérimentations. Cependant, les résultats du chapitre 3 stipule que le rendement est un caractère qui varie en fonction des environnements de cultures mais n'affecte pas ou peu la concentration en zinc (**Chapitre 3-4**). Nous ne pouvons ainsi que partiellement approuvée l'hypothèse 2, car la concentration en zinc est stable mais ne dépend pas ou peu du rendement.

H2: La concentration en zinc est un caractère stable mais en corrélation négatives avec le rendement dans toutes les expérimentations multisites.

Au vu des résultats du **Chapitre 4**, les stratégies d'absorption de zinc du sol-transfert racine a la biomasse-transfert dans les grains ne sont pas des processus continus. En effet selon la variabilité génétique des variétés, le zinc peut être soit directement transmis du sol vers les grains, soit accumulé dans les racines ou les feuilles ou les tiges avant d'être transmis dans le grain. L'abondance des zincs dans la biomasse ne se traduit pas par l'augmentation de la concentration de zinc dans les grains à maturité (**Chapitre 4**). Ainsi l'hypothèse 3 n'est pas confirmée.

H3: L'absorption de zinc du sol par la racine, le transfert de zinc dans la biomasse et l'accumulation de zinc dans les grains sont des processus continuent qui s'intensifient en fonction de la concentration du zinc dans les grains à maturité.

V-2-1 Limites et perspectives d'étude

Les approches proposées (Prédiction génomique et Gwas, physiologique) dans cette étude ont des limites mais permettent d'ouvrir d'autres perspectives qui vont compléter les résultats et alimenter les interprétations y afférentes.

Prédiction Génomiques

Les progrès des technologies de séquençage, ainsi que les efforts de la communauté, scientifique ont rendu publiquement accessible une grande quantité de données génomiques du riz. L'objectif du **chapitre 2** était d'explorer l'architecture génétique de la concentration en zinc sur la base des données publiquement disponibles, principalement du 3000 Génome du riz du Projet 3K-RGP de l'IRRI. Les études d'association à l'échelle du génome (GWAS) et l'approche des sélections génomiques (GS) ne peuvent pas se faire sans ces données génomiques. Cependant, une banque de gène regroupant 7000 variétés locales et introduites se trouve en la possession du FOFIFA (Centre de Recherche Nationale appliquée à l'Agriculture et le Développement Rural). Mais les données génomiques de ce germoplasme ne sont pas encore disponibles à ce jour. Un projet de séquençage serait un grand pas pour ouvrir plusieurs portes sur les modes de sélections modernes effectives, moins couteuses et plus rapides.

Pour cela les démarches et méthodes effectuées pour ces séquençages sont les suivant :

Sélection des accessions à séquencer

Dans les 7000 variétés locales et introduites de la collection de FOFIFA, il faut filtrer en vue de savoir les variétés déjà séquencées par le projet 3K-RGP.

Les variétés seront ainsi sélectionnées au hasard dans une collection principale du reste des accessions d'O. sativa filtrée qui ont été établies par un schéma de sélection semistratifié en tenant compte des facteurs, tels que le pays d'origine en priorisant celles de Madagascar, le type éco-culturel et le groupement variétal avec une couverture uniforme de l'espace de nom tout en limitant les doublons potentiels de chaque pays et en tenant compte du budget existant.

- Séquençage

L'ADN génomique a été préparé à partir de feuilles récoltées en vrac d'une seule jeune plante pour chaque accession échantillonnée. Des échantillons d'ADN génomique seront ensuite expédiés à une firme de séquençage et seront utilisés pour construire des bibliothèques d'index Illumina en suivant le protocole du fabricant. Suivi de la qualité contrôle, au moins 3 µg d'ADN génomique de chaque échantillon seront fragmenté au hasard par sonication et fractionné en fonction de la taille par électrophorèse, et des fragments d'ADN d'environ 500 pb seront purifiés de chacune des accessions ont été étiquetées indépendamment en utilisant des identifiants multiplex nucléotidiques distincts de 6 pb, suivi d'une mise en commun avant la construction de la bibliothèque.

Par la suite, les lectures de chaque échantillon seront extraites en fonction de leur nucléotide unique identifiants multiplexés sous forme de lectures de 83 pb (90 - 6 - 1, où 1 est la base de ligature « T »). Pour garantir des données brutes de haute qualité, ils seront filtrés en supprimant les lectures présentant une contamination par l'adaptateur ou contenant plus de 50 % de bases de mauvaise qualité (valeur de qualité ≤ 5).

Lire l'alignement et l'identification des variantes

Les lectures propres seront cartographiées sur le japonica tempéré, Génome de référence Nipponbare – la version unifiée Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 (IRGSP-1.0), en utilisant le logiciel BWA avec les paramètres par défaut. L'identification des SNPs sera basé sur l'alignement à l'aide du Boîte à outils d'analyse du génome 2.0-35 (GATK) et Picard paquet V1.71 [16]. Pour minimiser le nombre de bases incompatibles pour les appels SNP et InDel, toutes les lectures de chaque accession a été ensuite nettoyée par :

(1) supprimer les lectures qui ne seront pas mappées sur la référence dans le résultat de l'alignement ;

- (2) supprimer les lectures en double (doublons) ;
- (3) réalisation de l'alignement ; et
- (4) recalibrer les réalignements.

Les données manquantes minimales ont ensuite été sélectionnées pour une analyse phylogénétique. Pour chacun de ces cinq ensembles, des matrices de distance utilisant le

Des arbres de consensus seront utilisés pour la visualisation de la topologie. Pour chacun des cinq arbres consensus, des informations préalables sur la désignation du groupe de variétés (basées sur la classification SSR ou isozymique) ont été utilisées.

Etudes d'association a l'échelle du Génome (GWAS)

A l'issus de l'étude effectuée au **chapitre 2**, huit (8) QTNs ont été identifiés répartis au niveau des chromosomes 2 ,4, 8, 11 et 12 dont le QTN11_3 du chromosome 11 à la position 28.681 -28.798 Mbp est le plus important.

Les étapes pour l'isolation de cet QTN est la création de marqueur qui va nous informer de la présence du QTN dans les autres variétés. En effet, ce marqueur permettra de valider la présence du QTN dans les variétés donneuses ayant une concentration élevée en zinc et son absence dans les variétés à faibles teneur en zinc servant ainsi dans un autre sens à valider les résultats du Chapitre 2 de cette thèse.

Après, l'isolation de ce marqueur et la validation de la présence ou pas du QTN dans les variétés à croiser, les croisements qui sont le début du programme de sélection et amélioration des plantes peuvent commencer. Les méthodes de création variétale utilisée peuvent être axée sur les croisement conventionnel, l'utilisation des sélections assistées par marqueurs ou la création des transgéniques.

Etudes physiologiques des variétés sélectionnées en termes de concentration en zinc.

La spécificité du **chapitre 4** réside sur le fait que les expérimentations se sont fait au niveau des champs des producteurs en conditions réelles. Alors que la plupart des études physiologique étudiant les flux de zinc dans la plante se faisaient au niveau des laboratoires. De ce fait, les limites y afférentes sont nombreuses. Premièrement, les analyses de sols ne sont pas fiables du fait que le zinc dans le sol dépend entièrement du pH et du potentiel redox qui est facilement affecté par l'oxydation. Deuxièmement, les racines ne pouvaient pas être échantillonnées du fait de la contamination avec les eaux d'irrigation et les sols des rizières. Ainsi, les données concernant l'absorption de zinc par le sol, le stockage de zinc dans les racines et le transport de celui-ci des racines à la biomasse sont manquantes. Et finalement, le risque de l'échantillonnage destructive est que les plantes échantillonnées pour chaque stade peuvent être très différents surtouts en termes de poids de la biomasse.

Cependant, cette méthode a été effective dans la mesure où les résultats ont montré que les sols des sites d'expérimentation ne sont pas déficients en zinc. Le transfert de zinc de la biomasse aux grains a été bien étudiée et identifiée en étant la principale barrière stoppant l'augmentation de la concentration en zinc dans les grains. Diverses théories ont été avancées comme origines de cette variabilité chez les différentes variétés : l'expression des transporteurs, existence de couche d'aleurone bloquant le zinc et la teneur élevée d'acide phytique retenant le zinc.

L'existence des transporteurs pendant le transfert de zinc dans le grain peut être identifiée par l'expression génique. En effet, chaque cellule d'un organisme contient le même ADN et, par conséquent, le même ensemble de gènes. Cependant, tous les gènes d'une cellule ne sont pas " activés " ou utilisés pour synthétiser des protéines. On dit qu'un gène est " exprimé " lorsque la protéine qu'il code est produite par la cellule. L'expression génique est régulée pour assurer une production convenable de protéines dans des cellules spécifiques à des moments précis. Suite à une extraction d'ARNm (ARN de transcription), la protéine peut être identifiée et par conséquent le gène responsable de son expression.

References bibliographiques

- Andersson, M. S., Saltzman, A., Virk, P. S., and Pfeiffer, W. H., (2017). Progress update: crop development of biofortified staple food crops under HarvestPlus. Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev. 17, 11905–11935. doi: 10.18697/ajfand.78.HarvestPlus05.
- Annicchiarico, P., (1997). Additive main effects and multiplicative interaction (AMMI) analysis of genotype-location interaction in variety trials repeated over years. TAG Theoretical and Applied Genetics, 94(8), 1072–1077. doi:10.1007/s001220050517.
- Babu, P. M., Neeraja, C. N., Rathod, S., Suman, K., Uttam, G. A., Chakravartty, N., Voleti, S. R., (2020). Stable SNP Allele Associations With High Grain Zinc Content in Polished Rice (Oryza sativa L.) Identified Based on ddRAD Sequencing. Frontiers in Genetics, 11. doi:10.3389/fgene.2020.00763.
- Baertschi C, Cao T-V, Bartholome J, Ospina Y, Quintero C, Frouin J, Bouvet JM, Grenier C (2021) Impact of early genomic prediction for recurrent selection in an upland rice synthetic population. G3. <u>https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab320</u>.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 21(2):263–265. <u>https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457</u>.
- Bashir, K., Ishimaru, Y., and Nishizawa, N. K. (2012). Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. Plant Soil 361, 189–201. doi: 10.1007/s11104-012-1240-5
- Bashir, K., Ishimaru, Y., and Nishizawa, N. K. (2012). Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. Plant Soil 361, 189–201. doi: 10.1007/s11104-012-1240-5
- Bernardo R (1994) Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. Crop Sci 34:20–25
- Berti, C., Faber, M., Smuts, M., (2014). Prevention and control of micronutrient deficiencies in developing countries: current perspectives. Nutrition and Dietary Supplements, 41. doi:10.2147/nds.s43523 10.2147/nds.s43523.
- 10. Blanche, S. B., Utomo, H. S., Wenefrida, I., & Myers, G. O., (2009). Genotype \times

Environment Interactions of Hybrid and Varietal Rice Cultivars for Grain Yield and Milling Quality. Crop Science, 49(6), 2011. doi:10.2135/cropsci2009.04.0175.

- Bouis HE, Hotz C, McClaferty B, Meenakshi JV, Pfeifer WH (2011) Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. Food Nutr Bull 32:S31–S40. <u>https://doi.org/10.1177/15648265110321S105</u>
- 12. Bouis HE, Saltzman A (2017) Improving nutrition through biofortification. a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. Glob Food Secur 12:49–58
- Bouis, H.E., (2002). Plant Breeding: A New Tool for Fighting Micronutrient Malnutrition. J Nutr132:491S-494S. doi: 10.1093/jn/132.3.491S.
- Bouis, H.E., Welch, R.M., (2010). Biofortification: a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. Crop Science. 50: S–20– S–32. doi:10.2135/cropsci2009.09.0531.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A., (2007). Zinc in plants. New Phytologist, 173(4), 677–702. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x.
- Browning BL, Browning SR (2016) Genotype imputation with millions of reference samples. Am J Hum Genet 98:116–126. <u>https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.11.020</u>
- Bukovac, M. J., and Wittwer, S. H. (1957). Absorption and mobility offoliar applied nutrients. Plant Physiol. 32, 428–435. doi: 10.1104/pp.32.5.428.
- 18. Cakmak I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? Plant and Soil 302, 1–17.
- Chen, J., Xu, Y., Fei, K., Wang, R., He, J., Fu, L., (2020). Physiological mechanism underlying the effect of high temperature during anthesis on spikelet-opening of photo-thermo-sensitive genic male sterile rice lines. Sci Rep. Nature Publishing Group;10: 2210–13. doi:10.1038/s41598-020-59183-0.
- Cruz, R.P.D., Milach, S.C.K., Federizzi, L.C., (2008). Inheritance of panicle exsertion in rice. Sci agric (Piracicaba, Braz). Scientia Agricola; 65: 502–507. doi:10.1590/S0103-90162008000500009.
- Cu ST, Warnock NI, Pasuquin J, Dingkuhn M, Stangoulis JCR (2021) A highresolution genome-wide association study of the grain ionome and agronomic traits in rice Oryza sativa subsp indica. Sci Rep. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-021-98573-w</u>

- Endelman JB (2011) Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. Plant Genome 4:250–255
- Fernández, V., & Brown, P. H. (2013). From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. Frontiers in Plant Science, 4. doi:10.3389/fpls.2013.00289
- Frossard, E., Bucher, M., Mächler, F., Mozafar, A., Hurrell, R., (2000). Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. J Sci Food Agric. John Wiley & Sons, Ltd ;80: 861–879. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<861::AID-JSFA601>3.0.CO2-P.
- Galetti, V., (2018). Zinc Deficiency and Stunting. In: Preedy, V., Patel, V. eds. Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation. Springer, Cham. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-40007-5_93-1</u>.
- Goloran, J. B., Johnson-Beebout, S. E., Morete, M. J., Impa, S. M., Kirk, G. J. D., & Wissuwa, M., (2019). Grain Zn concentrations and yield of Zn-biofortified versus Zn-efficient rice genotypes under contrasting growth conditions. Field Crops Research, 234, 26–32. doi:10.1016/j.fcr.2019.01.011.
- 27. Grenier C, Cao TV, Ospina Y, Quintero C, Châtel MH, Tohme J, Courtois B, Ahmadi N (2015) Accuracy of genomic selection in a rice synthetic population developed for recurrent selection breeding. PLoS One 10:e0136594
- Hacisalihoglu, G., and Kochian, L. V. (2003). How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in cropplants. New Phytol. 159, 341– 350. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00826.x
- 29. Harvest Plus (2021) Biofortifcation prioritization index. https://www.harvestplus.org/knowledge-market/BPI. Accessed 27 Jul 2021
- Heredia MC, Kant J, Prodhan A, Dixit S, Wissuwa M (2021) Breeding rice for a changing climate by improving adaptations to water saving technologies. Theor Appl Genet. <u>https://doi.org/10.1007/s00122-021-03899-8</u>.
- Herrington, C.H., (2019). Prioritizing Countries for Biofortification Interventions: Biofortification Priority Index Second Edition (BPI 2.0): 1–65.
- Higuchi K, Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2001) Analysis of transgenic rice containing barley nicotianamine synthase gene. Soil Sci

Plant Nutr 47:315-322

- Holland JB, Nyguist WE, Cervantes-Martínez CT (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. Plant Breed Rev 22:11–112
- Hotz, C., and Brown, K.H., (2004). International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG). Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. eds. Food and Nutrition Bulletin 25: S91-S202.
- 35. https://bpi.harvestplus.org
- 36. https://www.harvestplus.org/crop/zinc-rice
- Huang, X., Jang, S., Kim, B., Piao, Z., Redoña, E., Koh, H-J.,(2021). Evaluating genotype × environment interactions of yield traits and adaptability in rice cultivars grown under temperate, subtropical and tropical environments. Agriculture (Switzerland). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi:10.3390/agriculture11060558.
- Impa, S. M., and Johnson-Beebout, S. E. (2012). Mitigating zinc deficiency and achieving high grain Zn in rice through integration of soil chemistry and plant physiology research. Plant Soil 361, 3–41. doi: 10.1007/s11104-012-1315-3
- Impa, S. M., Morete, M. J., Ismail, A. M., Schulin, R., and JohnsonBeebout, S. E. (2013). Zn uptake, translocation and grain Zn loading in rice (Oryza sativa L.) genotypes selected for Zn deficiency tolerance and high grain Zn. J. Exp. Bot. 64, 2739–2751. doi: 10.1093/jxb/ert118.
- Inabangan-Asilo, M. A., Mallikarjuna Swamy, B. P., Amparado, A. F., Descalsota-Empleo, G. I. L., Arocena, E. C., & Reinke, R., (2019). Stability and G × E analysis of zinc-biofortified rice genotypes evaluated in diverse environments. Euphytica, 215(3). doi:10.1007/s10681-019-2384-7.
- 41. Inoue H, Higuchi K, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2003) Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in longdistance transport of iron and differentially regulated by iron. Plant J 36:366–381
- 42. James C. R. Stangoulis et Marija Knez, 2022, Biofortification of major crop plants with iron and zinc -achievements and future directions. Plant Soil (2022) 474:57–76.
- 43. Jiang W, Struik PC, van Keulen H, Zhao M, Jin LN, Stomph TJ (2008) Does

increased Zn uptake enhance grain Zn mass concentration in rice? Ann Appl Biol 153:135–147. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00243.x

- 44. Jiang, W., Struik, P. C., Lingna, J., van Keulen, H., Ming, Z., and Stomph, T. J. (2007). Uptake and distribution of root-applied or foliar-applied 65Zn after flowering in aerobic rice. Ann. Appl. Biol. 150, 383–391. doi: 10.1111/j.1744-7348.2007.00138.x
- Johnson, A. A. T., Kyriacou, B., Callahan, D. L., Carruthers, L., Stangoulis, J.,Lombi, E., et al. (2011). Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron and zinc-biofortification of rice endosperm. PLoS ONE 6:e24476. doi: 10.1371/journal.pone.0024476.
- 46. Johnson-Beebout SE, Goloran JB, Rubianes FHC, Jacob JDC, Castillo OB (2016) Zn uptake behavior of rice genotypes and its implication on grain Zn biofortification. Sci Rep 6:38301. <u>https://doi.org/10.1038/srep38301</u>
- Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, Eskin E (2008) Efcient control of population structure in model organism association mapping. Genet 178:1709–1723. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.107.080101</u>
- Kennedy, G., Nantel, G., Shetty, P., (2003). The scourge of hidden hunger: global dimensions of micronutrient deficiencies. Food Nutr Agric 32:8-16.
- 49. Koç E, Karayiğit B (2021) Assessment of biofortification approaches used to improve micronutrient-dense plants that are a sustainable solution to combat hidden hunger. J Soil Sci Plant Nutr. <u>https://doi.org/10.1007/s42729-021-00663-1</u>
- Kochian, L. V. (1991). "Mechanisms of micronutrient uptake and translocation inplants," in Micronutrients in Agriculture, ed J. J. Mortvedt (Madison, WI: SoilSci. Soc. Am., Inc), 229–296.
- 51. Kuznetsova A, Brockhof PB, Christensen RHB (2017) Imertest package: tests in linear mixed efects models. J Stat Softw 82:1–26. <u>https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13</u>
- Lee JS, Wissuwa M, Zamora OB, Ismail AM (2018) Novel sources of aus rice for zinc deficiency tolerance identifed through association analysis using a high-density SNP array. Rice Sci 25:293–296. https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.08.004
- 53. Lee, S., Persson, D. P., Thomas, H. Hansen, T. H., Husted, S., Schjoerring, J. K., et al. (2011). Bio-available zinc in rice seeds is increased by activation tagging of

nicotianamine synthase. Plant Biotechnol. J. 9, 865–873. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00606.x.

- Liang, J., Li, Z., Tsuji, K., Nakano, K., Nout, M. J. R., & Hamer, R. J. (2008). Milling characteristics and distribution of phytic acid and zinc in long-, medium- and shortgrain rice. Journal of Cereal Science, 48(1), 83–91. doi:10.1016/j.jcs.2007.08.003.
- Mabesa, R. L., Impa, S. M., Grewal, D., and Johnson-Beebout, S. E. (2013).Contrasting grain-Zn response of biofortification rice (Oryza sativa L.)breeding lines to foliar Zn application. Field Crops Res. 149, 223–233. doi:10.1016/j.fcr.2013.05.012.
- Mageto EK, Crossa J, Rodríguez PP, Dhliwayo T, Palacios-Rojas N, Lee M, Guo R, San Vicente F, Zhang X, Hindu V (2020) Genomic prediction with genotype by environment interaction analysis for kernel zinc concentration in tropical maize germplasm. G3 10:2629–2639. <u>https://doi.org/10.1534/g3.120.401172</u>
- 57. Mansueto L, Fuentes RR, Borja FN, Detras J, Abriol-Santos JM, Chebotarov D, Sanciangco M, Palis K, Copetti D, Poliakov A, Dubchak I, Solovyev V, Wing RA, Sackville Hamilton R, Mauleon R, McNally KL, Alexandrov N (2017) Rice SNPseek database update: new SNPs, indels, and queries. Nucleic Acids Res 45:D1075– D1081. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkw1135</u>
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants , 2nd edn. London: Academic Press.
- McDonald GK, Genc Y, Graham RD. 2008. A simple method to evaluate genetic variation in grain zinc concentration by correcting for differences in grain yield. Plant and Soil 306, 49–55.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. Genetics 157:1819–1829. <u>https://doi.org/10.1093/genetics/157.4.1819</u>
- Mori A, Kirk GJD, Lee JS, Morete MJ, Nanda AK, Johnson-Beebout SE, Wissuwa M (2016) Rice genotype diferences in tolerance of zinc-deficient soils: evidence for the importance of root-induced changes in the rhizosphere. Front Plant Sci 6:1160. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01160
- 62. Naik, S. M., Raman, A. K., Nagamallika, M., Venkateshwarlu, C., Singh, S. P.,

Kumar, S., Kumar, A., (2020). Genotype \times Environment interactions for grain iron and zinc content in rice. Journal of the Science of Food and Agriculture. doi:10.1002/jsfa.1045.

- Nguyen, V.H., Morantte, R.I.Z., Lopena, V., Verdeprado, H., Murori, R., Ndayiragije, A., (2023). Multi-environment Genomic Selection in Rice Elite Breeding Lines. Rice. Springer US; 1–17. doi:10.1186/s12284-023-00623-6.
- 64. Norton GJ, Douglas A, Lahner B, Yakubova E, Guerinot ML, Pinson SRM et al (2014) Genome wide association mapping of grain arsenic, copper, molybdenum and zinc in rice (Oryza sativa L.) grown at four international feld sites. PLoS One 9(2):e89685. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089685</u>
- Norton, G.J., Douglas, A., Lahner, B., Yakubova, E., Guerinot, M.L., Pinson, S.R.M., (2014). Genome Wide Association Mapping of Grain Arsenic, Copper, Molybdenum and Zinc in Rice (Oryza sativa L.) Grown at Four International Field Sites. Ali J, editor. PLoS ONE. e89685–12. doi:10.1371/journal.pone.0089685.
- Nozoye, T., von Wirén, N., Sato, Y., Higashiyama, T., Nakanishi, H., & Nishizawa, N. K. (2019). Characterization of the Nicotianamine Exporter ENA1 in Rice. Frontiers in Plant Science, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00502
- 67. Ogawa M, Tanaka K, Kasai Z. 1979. Accumulation of phosphorus, magnesium and potassium in developing rice grains: followed by electron microprobe X-ray analysis focusing on the aleurone layer. Plant and Cell Physiology 20, 19–27.
- Olsen, S. R. (1972). Micronutrient interactions. In Micronutrients in agriculture, ed. J. J. Mortvedt et al., 243–264. Madison, Wisc.: SSSA.
- Palmer LJ, Palmer LT, Rutzke MA, Graham RD, Stangoulis JCR (2014) Nutrient variability in phloem: examining changes in K, Mg, Zn and Fe concentration during grain loading in common wheat (Triticum aestivum). Physiol Plant 152:729–737
- Quijano-Guerta C, Kirk GJD, Portugal AM, Bartolome VI, McLaren GC. 2002. Tolerance of rice germplasm to zinc deficiency. Field Crops Research 76, 123–130.
- Rabeharisoa, L., Razanakoto, O.R., Razafimanantsoa, M.-P., Rakotoson, T., Amery, F., Smolders, E., (2012). Larger bioavailability of soil phosphorus for irrigated rice compared with rainfed rice in Madagascar: results from a soil and plant survey. Soil Use and Management 28, 448–456.

- Rakotondramanana, M.F., Tanaka, R., Pariasca-Tanaka, J., Stangoulis, J., Grenier, C., Wissuwa, M., (2022). Genomic prediction of zinc biofortifcation potential in rice gene bank accessions, Theoretical and Applied Genetics <u>https://doi.org/10.1007/s00122-022-04110-2</u>.
- 73. Rao SD, Neeraja CN, Madhu Babu P, Nirmala B, Suman K, Rao LVS, Surekha K, Raghu P, Longvah T, Surendra P, Kumar R, Babu VR, Voleti SR (2020) Zinc biofortifed rice varieties: challenges, possibilities, and progress in India. Front Nutr 7:26. <u>https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00026</u>
- 74. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R (2013) Zinc and its importance for human health: an integrative review. J Res Med Sci 18:144–157
- Saltzman, A., Birol, E., Bouis, H. E., Boy, E., de Moura, F. F., Islam, Y., et al. (2013).Biofortification: progress toward a more nourishing future. Glob. Food Secur. 2,9–17. doi: 10.1016/j.gfs.2012.12.003
- 76. Sanjeeva Rao, D., Neeraja, C.N., Madhu Babu, P., Nirmala, B., Suman, K., Rao, L.V.S., Surekha, K., Raghu, P., Longvah, T., Surendra, P., Kumar, R., Babu, V.R., Voleti, S.R., (2020). Zinc biofortifed rice varieties: challenges, possibilities, and progress in India. Front Nutr 7:26. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00026.
- Shahzad, Z., Rouached, H., Rakha, A., (2014). Combating Mineral Malnutrition through Iron and Zinc Biofortification of Cereals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13(3), 329–346. doi:10.1111/1541-4337.12063.
- Sharma, A., Patni, B., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S.C., (2013). Zn: an indispensable micronutrient. Physiol Mol Biol Plants 19:11–20.
- Shiratori, S., Nishide, A., (2018). Micronutrient supply based on the food balance sheet and the prevalence of inadequate intakes in madagascar. Proc Nutr Soc 77(OCE3):E7.
- Solomons, N. W. (2009). La dénutrition dans les pays en voie de développement des aspects évolutifs. Annales Nestlé (Ed. Française), 67(2), 74–86. doi:10.1159/00027875.
- Sperotto, R. A. (2013). Zn/Fe remobilization from vegetative tissues to rice seeds: should I stay or should I go? Ask Zn/Fe supply. Front. Plant Sci. 4:464. doi:10.3389/fpls.2013.00464

- Sperotto, R. A., Boff, T., Duarte, G. L., Santos, L. S., Grusak, M. A., and Fett, J. P. (2010). Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains. J. Plant Physiol. 167, 1500–1506. doi: 10.1016/j.jplph.2010.05.003
- Sperotto, R. A., Ricachenevsky, F. K., Duarte, G. L., Boff, T., Lopes, K. L., Sperb, E. R., et al. (2009). Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABAdependent transcription factor. Planta 230, 985–1002. doi: 10.1007/s00425-009-1000-9.
- 84. Stewart CP, Fernald LCH, Weber AM, Arnold C, Galasso E (2020) Lipid-based nutrient supplementation reduces child anemia and increases micronutrient status in sadagascar: a multiarm cluster ranndomized controlled trial. J Nutr 150:958–966. https://doi.org/10.1093/jn/nxz320
- Stomph, T. J., Jiang, W., and Struik, P. C. (2009). Zinc biofortification of cereals: rice differs from wheat and barley. Trends Plant Sci. 14, 123–124. doi: 10.1016/j.tplants.2009.01.001
- 86. Suman,K., Neeraja, C.N., Madhubabu, P., Rathod, S., Bej, S., Jadhav, K.P., Kumar, J.A., Chaitanya, U., Pawar, S.C., Rani, S.H., Subbarao, L.V., Voleti, S.R., (2021). Identification of Promising RILs for High Grain Zinc Through Genotype × Environment Analysis and Stable Grain Zinc QTL Using SSRs and SNPs in Rice (Oryza sativa L.)
- Swamy BPM, Kaladhar K, Anuradha K, Batchu AK, Longvah T, Sarla N (2018) QTL analysis for grain iron and zinc concentrations in two O. nivara derived backcross populations. Rice Sci 25(4):197–207
- Swamy BPM, Rahman MA, Inabangan-Asilo MA, Amparado A, Manito C, Chadha-Mohanthy P, Reinke R, Slamet-Loedin IH (2016) Advances in breeding for high grain zinc in rice. Rice 9:49
- 89. Tanaka R, Mandaharisoa ST, Rakotondramanana M, Ranaivo HN, Pariasca-Tanaka J, Kanegae HK, Iwata H, Wissuwa M (2021) From gene banks to farmer's felds: using genomic selection to identify donors for a breeding program in rice to close the yield gap on smallholder farms. Theor Appl Genet 134:3397–3410. https://doi.org/10.1007/s00122-021-03909-9
- 90. The World Bank (2016) Addressing chronic malnutrition in Madagascar.

malnutrition-in-Madagascar. <u>https://www.worldbank.org/en/</u> programs/sief-trust-fund/brief/addressing-chronic-malnutrition in-madagascar. Accessed 20 July 2021

- UNICEF (2019) The state of the world's children 2019: children, food and nutrition. Unicef, New York.
- 92. UNICEF-WHO-The World Bank., (2017). Joint child malnutrition estimates. http://www.who.int/nutgrowthdb/estimates2016/en/ (accessed March 2018).
- 93. Velu G, Crossa J, Singh RP, Hao Y, Dreisigacker S, Perez-Rodriguez P, Joshi AK, Chatrath R, Gupta V, Balasubramaniam A, Tiwari C, Mishra VK, Sohu VS, Mavi GS (2016) Genomic prediction for grain zinc and iron concentrations in spring wheat. Theor Appl Genet 129:1595–1605. <u>https://doi.org/10.1007/s00122-016-2726-y</u>
- 94. Virk, P.S., Andersson, M.S., Arcos, J., Govindaraj, M., Pfeifer, W.H., 2021. Transition from targeted breeding to mainstreaming of biofortification traits in crop improvement programs. Front Plant Sci 12:703990.
- 95. Wang SB, Feng JY, Ren WL, Huang B, Zhou L, Wen YJ et al (2016) Improving power and accuracy of genome-wide association studies via a multi-locus mixed linear model methodology. Sci Rep 6:19444. <u>https://doi.org/10.1038/srep19444</u>
- 96. Wang, F., Rose, T., Jeong, K., Kretzschmar, T., & Wissuwa, M. (2015). The knowns and unknowns of phosphorus loading into grains, and implications for phosphorus efficiency in cropping systems. Journal of Experimental Botany, 67(5), 1221–1229. doi:10.1093/jxb/erv517
- 97. Wheal MS, Fowles TO, Palmer LT (2011) A cost-effective acid digestion method using closed polypropylene tubes for inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis of plant essential elements. Anal Methods 3:2854– 2863
- White, P. J., and Broadley, M. R. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. Front. Plant Sci. 2:80. doi: 10.3389/fpls.2011.00080.
- Willis, M. S., Monaghan, S. A., Miller, M. L., McKenna, R. W., Perkins, W. D., Levinson, B. S., ... Kroft, S. H. (2005). Zinc-Induced Copper Deficiency. American Journal of Clinical Pathology, 123(1), 125–131. doi:10.1309/v6gvyw2qtyd5c5pj.
- 100. Wissuwa, M., Ismail, A.M., Graham, R.D., (2008). Rice grain zinc concentrations as afected by genotype native soil-zinc availability and zinc fertilization. Plant Soil

306:37-48.

- 101. World Food Program., (2016). Fill the Nutrient Gap Madagascar: Full Report October2016.https://docs.wfp.org/api/documents/837cea77cbe0487d923644497b75 4ec4/download/?iframe.
- 102. World Food Programme (2010) Fighting hunger worldwide. <u>https://documents.wfp.org/stellent/groups/public/documents/communications/wfp2</u> 20666.pdf. Accessed 27 Jul 2021
- 103. Wu, C., Lu, L., Yang, X., Feng, Y., Wei, Y., Hao, H., et al. (2010). Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. J. Agric. Food Chem. 58, 6767–6773. doi:10.1021/jf100017e.
- 104. Xu Y, Yang T, Zhou Y, Yin S, Li P, Liu J, Xu S, Yang Z, Xu C (2018) Genome-wide association mapping of starch pasting properties in maize using single-locus and multi-locus models. Front Plant Sci 9:1311. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01311</u>
- 105. Yan, W., Hunt, L.A., Sheng, Q., Szlavnics, Z., (2000). Cultivar evaluation and megaenvironment investigation based on the GGE biplot. Crop Science.1;40(3):597-605.
- 106. Yasmin Z, Paltridge N, Graham R, Huynh B-L, Stangoulis J (2014) Measuring genotypic variation in wheat seed iron frst requires stringent protocols to minimize soil iron contamination. Crop Sci 54:255–264
- 107. Yoneyama, T., Gosho, T., Kato, M., Goto, S., and Hayashi, H. (2010). Xylem and phloem transport of Cd, Zn and Fe into grains of rice plants (Oryza sativa L.) grown in continuously flooded Cd-contaminated soil. Soil Sci. Plant Nutr. 56, 445–453. doi: 10.1111/j.1747-0765.2010.00481.x
- 108.Zhang W-H, Zhou Y, Dibley KE, Tyerman SD, Furbank RT, Patrick JW. (2007). Review: Nutrient loading of developing seeds. Functional Plant Biology 34, 314–33
- 109.Zhang Y, Liu P, Zhang X, Zheng Q, Chen M, Ge F et al (2018) Multilocus genomewide association study reveals the genetic architecture of stalk lodging resistancerelated traits in maize. Front Plant Sci 9:611. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00611
- 110.Zimmermann, M. B., & Hurrell, R. F. (2007). Nutritional iron deficiency. The Lancet, 370(9586), 511–520. doi:10.1016/s0140-6736(07)61235-5

ANNEXES

Annexe1 : La liste de tous les QTN détectés avec un LOD>3 pour les 6 types d'approches de multiloci.

	Method	Chromosome	Marker position (bp)	LOD score	r2 (%)	QTN effect	'-log10(P)'	MAF	Reference allele
FASTmrMLM	1		22.894.730	4.12	2.32	0.75	4.88	0.19	С
pKWmEB	1		39.230.103	3.76	2.21	0.71	4.50	0.11	Т
pKWmEB	2		17.960.992	5.66	3.36	-0.71	6.48	0.23	G
pLARmEB ISIS EM-	2		17,960,992	5.12	0.43	-0.73	5.92	0.23	G
BLASSO	2		18,049,726	3.60	1.98	0.59	4.33	0.31	А
FASTmrEMMA	2		18,697,369	4.88	2.25	1.17	5.67	0.46	А
FASTmrMLM	2		18,697,369	3.16	1.61	0.49	3.86	0.46	А
mrMLM	2		18,697,369	5.09	5.51	0.90	5.89	0.46	А
pKWmEB ISIS EM-	2		18,697,369	3.21	2.76	0.40	3.92	0.46	А
BLASSO	2		18,702,652	4.54	1.93	-0.76	5.32	0.15	G
pLARmEB	2		23,542,598	3.28	0.23	0.53	3.99	0.23	G
pKWmEB	2		23,859,498	4.28	2.18	-0.46	5.04	0.31	G
pKWmEB	2		26,062,853	5.40	2.17	0.63	6.22	0.22	G
pLARmEB	2		26,062,853	5.08	0.42	0.71	5.88	0.22	G
FASTmrEMMA	2		26,642,718	6.96	2.18	4.53	7.82	0.02	С
FASTmrMLM ISIS EM-	2		29,509,947	3.58	1.49	-0.47	4.30	0.45	С
BLASSO	2		29,527,473	3.79	2.15	0.59	4.53	0.36	Т
pLARmEB ISIS EM-	2		29,527,473	4.12	0.36	0.56	4.88	0.36	Т
BLASSO	2		33,513,661	6.62	3.62	-0.77	7.48	0.36	А
FASTmrEMMA	2		34,591,624	6.45	2.76	1.49	7.30	0.25	А
FASTmrMLM ISIS EM-	2		34,591,624	3.94	1.50	0.55	4.69	0.25	А
BLASSO	4		2,855,791	6.36	3.35	1.00	7.21	0.14	С
pLARmEB	4		2,855,791	5.13	0.37	0.78	5.94	0.14	С
FASTmrEMMA	4		19,962,827	5.83	4.03	2.64	6.66	0.10	G
FASTmrMLM	4		20,025,747	7.79	5.91	1.17	8.67	0.21	С
pKWmEB	4		20,025,747	3.71	2.53	0.60	4.44	0.21	С
pLARmEB	4		20,025,747	4.18	0.43	0.74	4.94	0.21	С
mrMLM	4		20,216,584	4.77	3.36	0.90	5.56	0.20	G

mrMLM	5	298,905	6.93	6.17	-1.00	7.79	0.34	А
pKWmEB	5	298,905	8.36	7.10	-0.72	9.26	0.34	Α
pKWmEB	5	6,476,920	8.35	3.90	0.87	9.26	0.17	Т
pLARmEB	5	6,476,920	5.43	0.48	0.83	6.24	0.17	Т
FASTmrEMMA	5	6,743,045	4.74	1.85	1.09	5.53	0.36	G
mrMLM	5	6,743,045	4.75	4.28	0.83	5.54	0.36	G
FASTmrEMMA ISIS EM-	6	17,387,954	3.88	1.69	-1.37	4.62	0.16	Т
BLASSO	6	24,657,679	3.67	1.72	-0.64	4.41	0.19	Т
FASTmrEMMA	6	27,593,842	4.92	1.82	-1.81	5.72	0.09	G
FASTmrMLM	7	8,079,033	3.75	1.44	-0.49	4.49	0.33	Т
FASTmrEMMA	7	25,284,257	5.80	2.40	1.88	6.62	0.12	А
mrMLM	8	1,576,418	11.47	7.69	-1.50	12.43	0.15	С
pKWmEB	8	1,576,418	5.34	3.23	-0.69	6.15	0.15	С
FASTmrEMMA ISIS EM-	8	8,320,367	5.61	3.41	-1.77	6.43	0.21	А
BLASSO	8	16,004,448	3.60	1.66	0.57	4.33	0.26	Α
FASTmrEMMA	8	26,505,039	6.51	2.20	1.86	7.36	0.11	G
FASTmrMLM	8	26,505,039	7.49	2.67	1.03	8.37	0.11	G
pKWmEB	8	26,505,039	6.68	3.03	0.91	7.53	0.11	G
pLARmEB ISIS EM-	8	26,505,039	5.64	0.47	1.02	6.46	0.11	G
BLASSO	9	14,708,413	3.92	2.36	1.93	4.67	0.02	G
pKWmEB	9	14,873,405	4.37	2.36	-1.16	5.14	0.04	Т
mrMLM	9	21,095,287	4.73	2.96	0.66	5.51	0.49	G
FASTmrMLM ISIS EM-	10	14,217,374	3.61	1.39	1.02	4.35	0.06	G
BLASSO	10	14,217,374	3.91	1.84	1.18	4.66	0.06	G
mrMLM	10	14,217,374	4.42	3.01	1.51	5.20	0.06	G
pKWmEB	10	14,217,374	7.62	3.52	1.40	8.50	0.06	G
pLARmEB	10	14,217,374	4.15	0.32	1.16	4.90	0.06	G
FASTmrEMMA	11	18,574,240	5.55	2.53	-1.85	6.37	0.13	G
FASTmrMLM	11	21,241,457	4.57	2.32	-0.59	5.35	0.44	С
pKWmEB	11	21,241,457	6.40	3.16	-0.55	7.24	0.44	С
FASTmrEMMA	11	26,517,281	8.87	4.09	1.63	9.78	0.37	G
FASTmrMLM	11	26,546,816	6.19	2.47	0.92	7.02	0.13	С
mrMLM	11	26,546,816	4.27	3.90	1.15	5.03	0.13	С
pKWmEB	11	26,546,816	8.59	4.86	0.96	9.49	0.13	С
pLARmEB	11	26,546,816	6.16	0.53	1.01	7.00	0.13	С
FASTmrEMMA	11	27,604,708	3.16	1.59	-1.36	3.87	0.16	Α
FASTmrMLM	11	27,604,708	6.01	1.91	-0.75	6.84	0.16	Α
pKWmEB	11	27,604,708	7.44	3.21	-0.82	8.32	0.16	А
pLARmEB	11	27,604,708	4.97	0.42	-0.83	5.76	0.16	Α
FASTmrEMMA	11	27,670,956	5.42	2.56	3.31	6.23	0.04	С
FASTmrMLM ISIS EM-	11	28,757,650	10.41	9.77	2.94	11.36	0.04	G
BLASSO	11	28,757,650	3.62	3.23	1.69	4.35	0.04	G

mrMLM	11	28,757,650	15.16	15.43	3.69	16.19	0.04	G
pKWmEB	11	28,757,650	13.63	8.81	2.41	14.64	0.04	G
pLARmEB	11	28,757,650	16.36	1.88	3.04	17.40	0.04	G
FASTmrMLM	12	7,184,806	4.79	1.77	0.87	5.57	0.10	Т
mrMLM	12	7,184,806	3.10	1.70	0.85	3.80	0.10	Т
pKWmEB	12	7,184,806	3.90	2.06	0.65	4.64	0.10	Т
FASTmrEMMA	12	7,186,588	8.50	3.11	2.39	9.40	0.09	Α
pKWmEB	12	17,986,208	3.25	1.63	-0.39	3.97	0.26	Т
mrMLM	12	23,920,185	5.19	4.30	0.81	6.00	0.42	Т
pKWmEB	12	25,131,839	3.81	2.34	0.79	4.55	0.06	С

Annexe 2 : Diagramme de Manhattan résumant les associations détectées à l'aide de six approches multi-locus. Les pics en rose identifient les associations détectées avec un LOD > 3,0 par au moins deux approches (les valeurs de LOD en rose sont les médianes des approches significatives).



Annexe 3 : Relation entre les marqueurs SNP dans la région s'étendant de 28,609 à 28,998 Mbp sur le chromosome 11. Deux blocs de liaison peuvent être discernés ; le bloc de gauche marqué par le triangle rouge (28,681 - 28,798 Mbp) contient le marqueur de pic (C11-28757650) identifié par GWAS multi-emplacement, ainsi que plusieurs autres marqueurs significativement associés à des concentrations élevées de Zn dans les grains.



Annexe 4 : Top 20 des accessions en termes de concentration de Zn prédites à l'aide du modèle complet.

ID	predicted_Zn_concentration	NAME	SUBPOPULATION	COUNTRY
IRIS_313_9368	40.176264	CHANDARHAT::IRGC 25845-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11174	36.715062	SLO 19::IRGC 35157-1	aus	India
IRIS_313_10594	35.813282	DJ 29::IRGC 8505-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_10600	35.536189	UCP 41::IRGC 8742-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11048	35.440857	AUS 171::IRGC 29004-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11060	35.201336	AUS 359::IRGC 29146-2	aus	Bangladesh
IRIS_313_10604	35.166299	DV 2::IRGC 8806-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11322	34.827331	JASURE AUS::IRGC 43860-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_10606	34.533688	DV 110::IRGC 8855-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_10965	34.365049	TILOKCHAN::IRGC 25927-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11053	34.33119	AUS 282::IRGC 29072-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_10587	34.250163	DB 3::IRGC 8361-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_12183	34.234159	SETYA::IRGC 88654-1	aus	Nepal
IRIS_313_11324	34.213728	KALABOKRI::IRGC 43872-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11017	34.186997	LOROI::IRGC 27567-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_10598	34.04066	DD 126::IRGC 8667-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_8410	33.840029	JABOR SAIL::IRGC 66831-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_11213	33.812753	NARIKEL BADI::IRGC 37550-1	aus	Bangladesh
IRIS_313_10595	33.790312	DL 5::IRGC 8593-1	aus	Bangladesh

Annexe 5 : Prévision des concentrations de Zn dans les grains en utilisant l'ensemble d'apprentissage complet (n = 253) par rapport à l'ensemble d'apprentissage excluant l'accession potentiellement influente IRIS_313_9368 ou les six accessions aus.



Annexe 6 : Performances moyennes des groupes de variétés (moyennes \pm écart-type) pour GY et Zn mesurées dans les quatre environnements de l'année 1.

Site	Group	GY	ZN
ANJ1	X265	4.91 ± 0.8	19.1 ± 0.71
	BF-Lines	4.05 ± 0.86	25.7 ± 2.85
	IR64	5.1 ± 0.77	21.56 ± 0.93
	IR68144	4.41 ± 1.03	25.7 ± 5.09
ANK1	X265	4.59 ± 0.48	17.51 ± 1.78
	BF-Lines	3.58 ± 0.67	23.45 ± 2.31
	IR64	3.72 ± 0.6	21.36 ± 1.2
	IR68144	2.66 ± 0.28	26.75 ± 2.05
MAR1a	X265	3.16 ± 0.88	17.5 ± 3.54
	Local	2.37 ± 0.71	21.2 ± 2.35
	BF-Lines	1.99 ± 0.45	25.11 ± 2.92
	IR64	2.27 ± 0.67	22.92 ± 2.57
	IR68144	1.35 ± 0.37	25 ± 2.83
MAR1b	X265	4.5 ± 1.08	20.5 ± 3.54
	Local	4.13 ± 0.66	20.5 ± 1.72
	BF-Lines	4.31 ± 0.82	24.2 ± 2.82

IR64	4.12 ± 0.76	22.5 ± 1.17
IR68144	3.47 ± 0.36	27.5 ± 2.12

Annexe 7 : Effet de l'engrais NPK sur les 7 sites au cours de l'expérimentation de la deuxième année pour la concentration en zinc du grain (a) et le rendement en grain (c) avec 5 sites (ANJ2a, ANJ2b, ANK2, BEN2a et BEN2b) du haut plateau et 2 sites (MAR2a et MAR2b) de la zone côtière Nord-Ouest. L'effet du traitement d'engrais NPK sur les 10 variétés dont 5 riz biofortifié, 2 lignées d'iris de la banque de gènes IRRI et 2 contrôles X265 et IR64 est montré pour la concentration en zinc du grain (b) et le rendement du grain (d) sous la deuxième année expérience.



Annexe 8 : Performances moyennes de tous les variétés testées pour GY et Zn (moyennes \pm écart-type) dans les sept environnements et les deux conditions de fertilisation durant l'année 2.

	G	iΥ	Zn		
	0-NPK	NPK	0-NPK	NPK	
ANJ2a	2.57 ± 0.75	3.31 ± 0.69	28.00 ± 7.79	27.89 ± 7.28	
ANJ2b	3.50 ± 0.62	4.12 ± 0.79	27.44 ± 6.28	28.74 ± 9.36	
ANK2	2.09 ± 0.80	1.86 ± 0.57	27.67 ± 6.70	27.41 ± 7.34	
BEN2a	1.22 ± 0.55	3.31 ± 1.19	26.30 ± 5.73	28.19 ± 6.63	
BEN2b	1.07 ± 0.42	2.36 ± 0.77	25.26 ± 5.80	25.74 ± 8.18	
MAR2a	3.29 ± 0.52	3.54 ± 0.60	28.71 ± 6.07	30.47 ± 5.26	
MAR2b	2.90 ± 1.32	5.26 ± 0.80	32.52 ± 7.43	30.70 ± 5.74	

Annexe 9 : Le biplot GGE 'Which WonWhere/What' du rendement pour la comparaison des variétés sur sept environnements sans apport (a) et avec apport de NPK (b), concentration en zinc sans apport (c) et avec apport NPK (d) au cours de l'année 2 expérience. Les diagrammes bipolaires GGE montrant les composantes 1 et 2 expliquant 72,81 % (a), 60,09 % (b), 94,56 % (c) et 94,22 % (d) de la variation totale. Les biplots ont été créés sur la base de Centering=0, SVP=2, Scaling=0.



Annexe 10 : Corrélation entre poids des grains et concentrations en zinc des variétés IRIS.

	X79Gr_ZnICP	X79GR_Wt	X1008Gr_ZnICP	X1008GR_Wt
X79Gr_ZnICP	1	0.654593	-0.4930437	0.1867262
X79GR_Wt	0.654593	1	-0.5898318	0.6810141
X1008Gr_ZnICP	-0.4930437	-0.5898318	1	-0.5210198
X1008GR_Wt	0.1867262	0.6810141	-0.5210198	1

