



Caractérisation écophysiological de différents génotypes de *medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe

Sophie Brunel

► To cite this version:

Sophie Brunel. Caractérisation écophysiological de différents génotypes de *medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe. Biologie végétale. Université d'Angers, 2008. Français. NNT : . tel-00449641

HAL Id: tel-00449641

<https://theses.hal.science/tel-00449641>

Submitted on 22 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Spécialité Sciences Agronomiques
Ecole Doctorale d'Angers

par

Sophie BRUNEL

CARACTERISATION ECOPHYSIOLOGIQUE
DE DIFFERENTS GENOTYPES DE *MEDICAGO TRUNCATULA*
AU COURS DES PHASES
DE GERMINATION ET DE CROISSANCE HETEROTROPHE

Devant le jury ci-dessous :

David Macherel	Professeur, Université d'Angers	Président du Jury
Gérard Duc	Directeur de Recherche, INRA Dijon	Rapporteur
Gilles Lemaire	Directeur de Recherche, INRA Lusignan	Rapporteur
Bernadette Julier	Chargé de Recherche, INRA Lusignan	Examinatrice
René Mathis	Ingénieur de Recherche, GEVES-BioGeves	Examineur
Carolyne Dürr	Ingénieur de Recherche, INRA Angers	Directrice de thèse

Co-encadrante : Béatrice Teulat-Merah, Maître de Conférence AgroCampus Ouest

Thèse préparée à l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences
Université d'Angers, INH, INRA
16, boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS CEDEX 01

THESE DE DOCTORAT

Spécialité Sciences Agronomiques
Ecole Doctorale d'Angers

par

Sophie BRUNEL

CARACTERISATION ECOPHYSIOLOGIQUE
DE DIFFERENTS GENOTYPES DE *MEDICAGO TRUNCATULA*
AU COURS DES PHASES
DE GERMINATION ET DE CROISSANCE HETEROTROPHE

Devant le jury ci-dessous :

David Macherel	Professeur, Université d'Angers	Président du Jury
Gérard Duc	Directeur de Recherche, INRA Dijon	Rapporteur
Gilles Lemaire	Directeur de Recherche, INRA Lusignan	Rapporteur
Bernadette Julier	Chargé de Recherche, INRA Lusignan	Examinatrice
René Mathis	Ingénieur de Recherche, GEVES-BioGeves	Examineur
Carolyne Dürr	Ingénieur de Recherche, INRA Angers	Directrice de thèse

Co-encadrante : Béatrice Teulat-Merah, Maître de Conférence AgroCampus Ouest

Thèse préparée à l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences
Université d'Angers, INH, INRA
16, boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS CEDEX 01

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse aujourd'hui achevé, je dois donc me soumettre à l'exercice Ô combien important des remerciements. Daniel Pennac l'avait bien compris et en mesure toute la difficulté dans son roman « Merci » dont voici un extrait :

« Le lauréat remercie d'abord le premier cercle : les notables, les importants, le jury, sans qui la récompense ne lui aurait pas été attribuée; puis le deuxième cercle : le public, vous en l'occurrence, qui êtes ici à vous réjouir pour moi, ce soir, et c'est très gentil à vous, vraiment, je vous en remercie, ça me... puis le troisième cercle : l'"équipe", sans laquelle son œuvre ne serait pas ce qu'elle est : "je tiens surtout à remercier mon équipe...", "tous ceux qui...", "tous ceux grâce à qui mon...", "tous ceux sans qui je n'aurais pas pu...", "je leur offre ce..." »

A mon tour de personnaliser le phrasé pour exprimer ma gratitude et l'amitié que je porte aux nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Mes remerciements se dirigent en premier lieu aux financeurs de ces travaux, la région Pays de Loire, ainsi qu'à l'organisme de valorisation de la recherche universitaire en Pays de Loire, UNIVALOIRE, dont j'ai été salariée pendant ma thèse.

Je remercie le jury de thèse d'avoir accepté d'examiner ces travaux : Gérard Duc et Gilles Lemaire qui en sont les rapporteurs ainsi que Bernadette Julier Koubaiti, David Macherel, et René Mathis.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse, qui se sont réunis à trois reprises et qui m'ont permis de poursuivre le travail en apportant leur regard critique: Françoise Coste, Sylvie Ducournau, Isabelle Lejeune, Philippe Leterme, René Mathis, Frédéric Muel, Jean-Marie Prosperi, Marie-Paule Raveneau et Marie-Hélène Wagner.

Je tiens à remercier mes professeurs Daniel Gaillard et Gérard Dutruge pour m'avoir initiée aux sciences et m'avoir donné l'envie de continuer dans cette voie. Je suis aussi très reconnaissante envers à Cherie Gambley, qui m'a encadrée lors de mon stage effectué au laboratoire de pathologie végétale du DPI du Queensland en Australie, et Laurence VanOvertvelt ma maître de stage de fin d'études effectué au sein de l'entreprise Stallergènes. Leurs conseils avisés m'ont permis de trouver ma voie. Je tiens aussi à remercier Mariano Lacambra, pour m'avoir fait réfléchir sur ce que je voulais faire lors d'un entretien d'embauche...une véritable maïeutique.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Carolyne Dürr, ma directrice de thèse. Son encadrement m'a permis de développer la rigueur et l'exigence scientifique indispensables au bien mené d'une thèse et plus généralement d'un projet de recherche. Je la remercie chaleureusement en me remémorant les nombreuses discussions et fous rires que nous avons eus dans des moments « critiques » de rédaction ! Je la remercie aussi pour m'avoir permis de participer à des congrès et pour sa confiance lors de la présentation de mes travaux à Lisbonne, lors du congrès Grain Legume, en novembre 2007. Merci aussi de m'avoir aidée de nombreuses fois à ne pas passer de l'autre côté du cheval... !

Je remercie aussi Béatrice Teulat-Merah, ma co-encadrante pour son aide dans les analyses et la rédaction, sa disponibilité et son écoute. Son regard de généticienne, « traqueur » de diversité, m'a permis de voir les résultats sous un autre angle.

J'ai une pensée particulière pour Yves Crozat, le responsable du laboratoire d'écophysiologie végétale et d'agroécologie de l'ESA d'Angers de l'époque, qui avait accepté d'associer son laboratoire dans le cadre d'un co-encadrement nécessaire au financement de la thèse.

Tout ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans les actrices éponymes de cette thèse : les graines de *Medicago truncatula*. Je remercie particulièrement Jean-Marie Prosperi et Thierry Huguet pour m'avoir conseillée dans le choix des génotypes et bien sûr pour m'avoir fourni les graines nécessaires

à mes expériences. Je remercie également Magalie Delalande pour son implication dans le choix des génotypes, la préparation des échantillons, la rapidité de réponse à tous mes mails, et sa disponibilité quand je me suis rendue à Mauguio. Merci aussi à Denis Tauzin pour m'avoir révélé quelques secrets sur le battage des gousses et la culture de Medicago. Je souhaite remercier également Bruno Mary, Olivier Delfosse pour leur implication dans les expériences de dosage ainsi que Julia Buitink pour ses conseils et son aide avec la Dionex.

Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'UMR PMS et à la SNES. Je remercie Olivier Leprince, Directeur de l'UMR PMS et Joël Léchappé, Directeur de la SNES pour avoir accepté la responsabilité de m'accueillir dans leurs locaux. Je témoigne aussi toute ma gratitude à Sylvie Ducournau, Responsable du laboratoire de germination à la SNES, pour m'avoir permis de réaliser des expérimentations parfois conséquentes en me laissant disposer de moyens matériels et d'outils de phénotypage innovants qui ont contribué à l'originalité des mes travaux.

J'ai eu la chance d'avoir deux laboratoires d'accueil et ainsi de travailler de près ou de loin avec des nombreux collègues.

Merci aux collègues de l'UMR : Abdel, Benoît, David, Patrick, Julia, Françoise, Michèle, Pascale, Nicole Payet, Micheline, Edith, Sylvie, Nicole Clemenceau, et Marie-Hélène Macherel, pour les talents de chacun, les discussions et les gestes d'attention. Je tiens à remercier particulièrement ceux avec qui j'ai partagé le « bureau des thésards » : Dimitri, tu as laissé des ondes positives sur ton fauteuil si convoité dont j'ai hérité ; Virginie et Céline, merci pour votre bonne humeur inébranlable et votre dévouement envers notre pingouin fétiche ; William, merci pour ton bon sens et ton humour ; Emilie, merci pour tes sympathiques encouragements ; et enfin Paula, tu auras été une merveilleuse collègue de travail et amie, je te souhaite de réussir ici ou au Brésil « Vou entrar para visitá-lo ».

Merci au personnel de la SNES pour leur aide précieuse et leur disponibilité : Valérie, Jean Louis, Laurent, Gaétane, Claude, Fabien, Danièle, Laurent et Laurence Lecorre, Isabelle, Pierre, Emmanuelle, Fabien, Marie, Cécile, Frédérique, Jean Claude Lalande et Bruno Cariou. Merci aussi à Céline Andro pour sa bonne humeur et ton entrain à toute épreuve. Je remercie aussi Angélique pour sa gentillesse, son aide, son efficacité et pour m'avoir fait découvrir l'univers troglodyte ! Je remercie aussi chaleureusement Marie-Hélène Wagner, une véritable alliée : merci pour ton aide, ton pragmatisme, tes conseils avisés et tes encouragements. Lydie, tu as aussi été d'une aide inestimable surtout dans les moments les plus intenses : ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Je tiens à remercier Didier Demilly pour son expertise et sa participation active dans la mise en place et l'extraction des données de phénotypage réalisée sur le banc de germination.

Je souhaite remercier Antoine, Amélie et Estelle qui m'ont aidée dans la réalisation de mes expérimentations ; merci aussi Emilie et Florent qui ont réalisé leur stage de Master 1 au sein de l'équipe et avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler.

Je remercie aussi Antoine Gardarin, en thèse à l'UR LEG, pour nos échanges scientifiques car nous avons parfois les mêmes interrogations sur nos graines !

Mes remerciements s'adressent aussi à Jean Boiffin pour ses critiques constructrices, Jean-Noël Aubertot pour son investissement considérable dans la programmation SIMPLE, ainsi que Besnik Pumo et Rachid Boumaza pour les précisions statistiques qu'ils m'ont apportées. Many thanks to Joséphine Python for giving some helpful advice and helping to translate with accuracy.

Merci aussi à mon amie Manue pour sa relecture attentive des remerciements (je t'ai rajoutée !).

Je remercie très chaleureusement Delphine Moreau, que j'ai rencontrée au début de ma thèse quand j'ai participé au phénotypage de LR4 à l'UR LEG de Dijon. J'ai adoré travailler avec toi et j'espère que nos chemins professionnels se recroiseront. Merci pour tes messages d'encouragement et tes conseils fructueux ! Sache que tu as été mon modèle de thésarde au cours de ma thèse.

Dans un registre plus personnel, je souhaite remercier tout particulièrement mes parents, ma sœur, Caroline et son mari, Bruno qui m'ont apporté l'énergie et la confiance pour mener à terme ce travail. Je remercie aussi chaleureusement mes grands parents et ma « belle-famille » qui se sont toujours montrés intéressés par l'avancement de mes expériences.

Enfin, merci à Christophe, pour tout.

Ne juge pas chaque jour à la récolte que tu fais mais aux graines que tu sèmes.

Robert Louis Stevenson

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau In.1: Equations et variables d'entrée utilisée pour modéliser la germination et la levée dans le modèle SIMPLE (d'après Dorsainvil, 2002).

Tableau In.2: Nombre de chromosomes et taille du génome des principales Légumineuses (d'après Zhu *et al.*, 2005).

CHAPITRE I

Tableau 1.1 : Description of the studied genotypes.

Tableau 1.2 : Description of the genotypes and of their seed characteristics.

Tableau 1.3 : Final germination percentages at different temperatures and water potentials.

Tableau 1.4 : Base temperatures and water potentials for the different genotypes.

Tableau 1.5 : Hypocotyl and radicle final lengths at 20, 15 and 10°C.

Tableau 1.6 : Masses des semences et forces d'émergence mesurées pour différentes espèces.

Tableau 1.7 : Forces d'émergence mesurées (N, Newton) avec le même dispositif que pour M.tr. (Carrera, 2006).

Tableau 1.8 : Forces d'émergence (N, Newton) mesurées pour chaque génotype de *M.tr.*

Tableau 1.9 : Valeurs de paramètres de la fonction de probabilité de mortalité sous mottes pour les différents génotypes étudiés.

CHAPITRE II

Tableau 2.1 : Valeurs des paramètres d'entrée de SIMPLE récapitulées pour les quatre génotypes utilisés (lot A-06).

Tableau 2.2 : Profondeurs de semis.

Tableau 2.3 : Granulométrie du lit de semences (pourcentage en masse de l'échantillon de chaque classe de taille de mottes).

Tableau 2.4 : Causes de non levées observées (Obs) et simulées (Sim).

Tableau 2.5 : Caractéristiques des deux lits de semences simulés.

Tableau 2.6 : Valeurs des paramètres données aux idéotypes MtrFirst et MtrLast construits à partir des génotypes étudiés.

Tableau 2.7 : Valeurs des paramètres données aux idéotypes construits pour mesurer l'effet des différents paramètres. Les valeurs par défaut sont celles de MtrFirst et la valeur modifiée (spécifiée dans la colonne décrivant l'idéotype) est celle de MtrLast.

Tableau 2.8 : Données de pluviométrie et de température des deux premières décades suivant les dates de semis retenues pour analyser les effets respectifs des différents paramètres.

Tableau 2.9: Valeurs des variables de sortie du modèle pour les idéotypes dont la température de base et de la vitesse de germination ont été modifiées.

Tableau 2.10 : Valeurs des variables de sortie du modèle pour l'idéotype dont le potentiel hydrique de base de germination a été modifié.

Tableau 2.11 : Valeurs des variables de sortie du modèle pour les idéotypes dont la température de base d'allongement, de la vitesse d'allongement et la probabilité de passage sous croûte ont été modifiées.

CHAPITRE III

Tableau 3.1 : Récapitulatif des variables de phénotypage pour l'essai réalisé à l'UR LEG (Dijon).

Tableau 3.2 : Dispositif comprenant 12 blocs incomplets.

Tableau 3.3 : Récapitulatif des variables phénotypées pour l'essai réalisé à la SNES.

Tableau 3.4 : Analyse de variance testant les effets caméra et bloc pour la vitesse d'imbibition, d'allongement et les temps et le taux final de germination pour le génotype Paraggio en prenant en compte l'ensemble des répétitions.

Tableau 3.5 : Analyse de variance testant les effets LR, bloc et caméra pour la vitesse d'imbibition, d'allongement et les temps et le taux final de germination pour les LR en prenant en compte les 3 répétitions.

Tableau 3.6 : Analyse de variance testant les effets LR et caméra pour la vitesse d'imbibition, d'allongement et les temps et le taux final de germination pour Les LR en prenant en compte les 3 répétitions.

Tableau 3.7 : Valeurs moyennes, minima et maxima des variables phénotypées à l'UR LEG.

Tableau 3.8 : Valeurs moyennes, minima et maxima des variables phénotypées à la SNES.

Tableaux 3.9 : Matrice de corrélations entre les variables phénotypées à (a) l'UR LEG et (b) la SNES.

Tableaux 3.10 : Résultats de la détection QTL issus des résultats de l'essai mené à l'UR LEG par (a) SIM et par (b) CIM.

Tableaux 3.11 : Résultats de la détection QTL issus des résultats de l'essai réalisé à la SNES par (a) SIM et (b) CIM.

CONCLUSION

Tableau C.1 : Valeurs des paramètres décrivant la germination et la croissance hétérotrophe d'espèces cultivées.

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure In.1 : Déroulement de l'implantation d'une culture (adapté d'Aubertot, 1998).

Figure In.2 : Représentation schématique d'une graine de *Medicago truncatula* et de sa plantule au cours de la phase hétérotrophe.

Figure In.3 : Absorption d'eau par la semence au cours de la germination et du début d'allongement de la racine (d'après Bewley et Black, 1994).

Figure In.4 : Relation entre la température et la vitesse de germination. Cas de la moutarde (points : valeurs observées, lignes : ajustements, d'après Dorsainvil, 2000).

Figure In.5 : Schéma du fonctionnement de SIMPLE (d'après Dürr *et al.*, 2001).

Figure In.6 : Relations phylogéniques chez les Papilionacées. (d'après Choi *et al.*, 2004, Doyle and Luckow 2003, Zhu *et al.*, 2005).

Figure In.7 : Principales populations de lignées recombinantes connectées disponibles (schéma d'après thèse J.B.Pierre, 2008, B. Julier et T. Huguet, communications personnelles).

Figure In.8 : Démarche et objectifs des travaux de thèse, et perspectives envisagées.

CHAPITRE I

Figure 1.1 : Germination (a) at 20°C and 5°C (b) at 0 MPa and -0.75 MPa at 15°C, for M-05 seed lot and Paraggio Aust-04.

Figure 1.2 : Germination rates (1/t50 germination) (a) as a function of temperature and (b) as a function of water potential, for the three seed lots M-05, M-06, A-06 and Paraggio Aust-04.

Figure 1.3 : Germination time courses expressed in thermal time (°Cd) (a) at 5, 10, 15°C for two genotypes, A17 and F83005.5 in M-05 seedlot; and by pooling all the temperatures for each genotype of M-05 (b), M-06 (c), A-06 (d) seed lots and Paraggio Aust-04.

Figure 1.4 : Hypocotyl and radicle elongation at 20 and 10°C for the M-05 genotypes and Paraggio Aust-04.

Figure 1.5 : Hypocotyl elongation rate (1/time after germination for 30 mm length) according to temperature for M-05, A-06 seed lots and Paraggio Aust-04.

Figure 1.6 : Elongation time courses expressed in thermal time (°Cd) after germination (a) at 10, 15, 20°C for two genotypes A17 and F83005.5 in M-05 and A-06; and (b) when gathering all the temperatures for each genotype of M-05, A-06 and Paraggio Aust-04.

Figure 1.7 : Changes in seedling part dry masses over time for A17 and F83005.5 at 20°C and 10°C.

Figure 1.8 : Principal component analysis plot of germination and elongation data for the genotypes.

Figure 1.9 : Dispositif de mesure des forces d'émergence : enceinte renfermant les capteurs et détails de la mise en place d'une plantule (axe de l'hypocotyle) sous la jauge.

Figure 1.10 : Enregistrement de la Force d'Emergence (N, Newton) au cours du temps après mise en place sous capteur pour le génotype A17.

Figure 1.11 : Distribution des forces d'émergence (N, Newton) mesurées pour le génotype Paraggio.

Figure 1.12 : Dispositif expérimental pour les mesures de mortalité sous mottes posées.

Le dispositif pour les mesures de mortalité sous mottes enfouies inclut une couche supérieure de terre.

Figure 1.13 : Pourcentages de plantules bloquées pour chaque génotype sous différentes tailles de mottes (a) mottes posées en surface, (b) mottes enfouies.

Figure 1.14 : Cinétiques d'imbibition à (a) 0 MPa et (b) -0.5 MPa de deux génotypes ayant des potentiels hydriques de base contrastés.

CHAPITRE II

Figure 2.1 : Cinétiques de germination dans la terre et sur buvard à différents teneurs en eau et potentiels hydriques (génotype Paraggio, 15°C).

Figure 2.2 : (a) Cinétiques de germination observées à 15°C dans la terre (-0.03 et -0.08MPa) et simulées avec ou sans décalage de 5°Cj imposés aux distributions des temps de germination (b) valeurs des critères statistiques calculés.

Figure 2.3 : (a) Cinétiques de levée observée et simulées avec et sans diminution du paramètre b_{elon} de la fonction d'allongement et (b) valeurs des critères statistiques calculés.

Figure 2.4 : Plan du dispositif expérimental de l'essai au champ.

Figure 2.5 : Température moyenne du sol et pluviométrie à partir du jour de semis.

Figure 2.6 : Teneurs en eau dans le lit de semences à partir du jour de semis.

Figure 2.7 : Exemple de distribution des profondeurs de semis (Paraggio).

Figure 2.8 : Cinétiques (a) de germination et (b) de levée des quatre génotypes observées au champ.

Figure 2.9 : Cinétiques de germination observées et simulées pour chaque génotype lors de l'essai réalisé au champ et valeurs des critères statistiques calculés.

Figure 2.10 : Cinétiques de levées observées et simulées pour chaque génotype observé au champ et valeurs des critères statistiques calculés pour les cinétiques de levées observées et simulées pour chaque génotype lors de l'essai réalisé au champ.

Figure 2.11 : Conditions météorologiques par décade sur la période de semis simulée (Août-Octobre 1994-2002, St Quentin. 02).

Figures 2.12 (a), (b), (c) et (d) : Résultats des simulations aux 7 dates de semis sur les années 1994 à 2002, pour les 5 génotypes; (a) taux finaux de levée ; (b) Nombre de jours pour atteindre 30% de levées ; (c) temps pour atteindre 80% de germination ; (d) causes de non levées.

Figures 2.13 (a), (b), (c) et (d) : Résultats des simulations aux 7 dates de semis sur les années 1994 à 2002, pour les 2 idéotypes MtrLast et MtrFirst et le cultivar Paraggio rappelé en référence; (a) taux finaux de levée ; (b) Nombre de jours pour atteindre 30% de levées ; (c) temps pour atteindre 80% de germination ; (d) causes de non levées.

Figure 2.14 : Résultats des simulations pour les différents idéotypes avec modification de la température de base Tb_{germ} et de la vitesse de germination STT .

Figure 2.15 : Résultats des simulations pour les différents idéotypes après modification du potentiel hydrique de base.

Figure 2.16 : Résultats des simulations pour les différents idéotypes créés avec modification des paramètres, de la vitesse d'allongement a , b et c , $Tball$, et la probabilité p de passage sous croûte ont été modifiées.

CHAPITRE III

Figure 3.1 : Différences observées entre les génotypes parentaux de trois populations de lignées recombinantes.

Figure 3.2 : Synthèse des principaux comportements contrastés identifiés à partir de la caractérisation écophysologique de *M.tr.*.

Figure 3.3 : Différences morphologiques entre Jemalong 6 et DZA315.16.

Figure 3.4 : (a) Production de lignées parentales pures. (b) Dispositif pour la multiplication des lignées recombinantes.

Figure 3.5 : Carte génétique de la population LR4.

Figure 3.6 : Dispositif expérimental dans les serres de l'UR LEG (Dijon).

Figure 3.7 : Histogrammes de distribution des valeurs des caractères phénotypés (LR4, UR LEG).

Figure 3.8 : Histogrammes de distribution des valeurs des caractères phénotypés (SNES).

Figure 3.9 : Projection sur la carte de référence de LR4 des positions des QTL détectés par SIM (s) et CIM (c). Résultats issus des essais réalisés à l'UR LEG et à la SNES.

LISTE DES ENCADRES

INTRODUCTION

Encadré In.1 : Méthodes de détection de QTL.

Encadré In.2 : Facteurs influençant la détection de QTL et paramètres quantifiant leurs effets.

CHAPITRE III

Encadré 3.1 : Description et principes d'utilisation du banc de germination et de la centrale d'acquisition des images- Mise au point pour le phénotypage de LR4.

ANNEXES

CHAPITRE III

Annexe 3.1 : Plan d'expérience utilisé pour le phénotypage de la population LR4 réalisé sur le banc de germination (SNES).

Annexe 3.2 : Evolution de la température enregistrée par 4 sondes thermiques (Testo ; 177- T3) disposées sur les buvards disposés sous chacune des 4 caméras, le long du banc de germination.

SOMMAIRE

INTRODUCTION. Contexte, Objectifs et Démarche

1. Un cadre agro-écophysiologique pour caractériser la germination et la levée d'une plante.....	2
1.1. L'implantation d'un peuplement : une étape déterminante du cycle d'une culture	
1.2. Influence des génotypes et des caractéristiques des semences sur le déroulement de la germination et de la levée.....	
2. Apport de la modélisation pour l'étude de la germination et de la levée d'une espèce.....	10
2.1. Objectifs des modèles agro-écophysiologiques.....	
2.2. Le modèle de prévision des levées SIMPLE.....	
3. <i>Medicago truncatula</i>, l'espèce modèle retenue pour la caractérisation écophysiologique de la germination et de la croissance hétérotrophe	15
3.1. <i>Medicago truncatula</i> , plante modèle de la famille des Légumineuses	
3.2. Ressources biologiques et outils disponibles chez <i>Medicago truncatula</i> pour l'étude du déterminisme génétique.....	
4. Etapes de la démarche	20

CHAPITRE I. Un cadre d'analyse écophysiologique pour caractériser *Medicago truncatula* au cours de la germination et de la croissance hétérotrophe

1. Objectifs et démarche	23
2. Using A Model-Based Framework For Analysing Genetic Diversity During Germination And Heterotrophic Growth Of <i>Medicago Truncatula</i>	24
3. Effets de obstacles mécaniques.....	41
3.1. Forces d'émergence.....	
3.2. Taux de plantules bloquées par les mottes	
3.3. Synthèse sur les différences entre génotypes face aux obstacles mécaniques.....	
4. Synthèse générale	45

CHAPITRE II. Simulation numérique des effets de la diversité génétique sur la germination et la levée dans différentes conditions de semis

1. Objectifs et démarche	48
2. Evaluation du modèle.....	49
2.1. Evaluation du paramétrage des modules de prévision de la germination et de l'allongement.....	
2.2. Evaluation des prévisions du modèle	
2.3. Conclusion sur l'utilisation du modèle pour l'étude par simulation	
3. Etude par simulation des effets de la diversité génétique sur la levée	57
3.1. Démarche et conditions des simulations	
3.2. Résultats des simulations dans une large gamme de conditions de semis pour les génotypes caractérisés au laboratoire	
3.3. Simulation des levées des génotypes virtuels extrêmes	
3.4. Simulation des effets des différents paramètres	
4. Discussion des résultats de l'étude par simulation et conclusion	67

CHAPITRE III Déterminisme génétique de comportements au cours de la germination et du début de croissance

1. Démarche d'analyse du déterminisme génétique découlant de la diversité génétique.....	72
2. Identification de QTL impliqués dans les comportements observés au cours de la germination et du début de croissance à 20°C dans la population LR4.....	75
2.1. Caractéristiques des lignées parentales et création de la population de lignées recombinantes LR4..	
2.2. Construction de la carte génétique à partir de la population LR4	
2.3. Expérimentations de phénotypage haut débit.....	
2.4. Méthodes d'analyse de la variation phénotypique et d'identification de QTL	
2.5. Résultats de l'analyse de la variation phénotypique et de l'identification de QTL.....	
3. Discussion et perspectives	89
3.1. Bilan expérimental et méthodologique.....	
3.2. Intérêt de l'approche QTL pour l'étude des relations entre caractères et pour l'amélioration.....	
3.3. Comparaison des QTL identifiés dans notre étude avec des QTL identifiés chez <i>Medicago truncatula</i> et chez les Légumineuses cultivées	
3.4. Recherche de bases génétiques fonctionnelles	
3.5. Intégration de paramètres génétiques dans un modèle écophysologique	
CONCLUSION.....	97
REFERENCES.....	105
ANNEXES.....	

INTRODUCTION

CONTEXTE, OBJECTIFS ET DEMARCHE

Les travaux présentés ont pour objectif d'étudier le déroulement des étapes de germination et de croissance hétérotrophe conduisant à la levée, à l'échelle de la semence et de la plante entière, en caractérisant *Medicago truncatula* avec les outils de modélisation développés en agronomie.

Cette espèce est utilisée en tant que modèle pour les études de génétique et biologie moléculaire. Le cadre d'analyse apporté par un modèle de prévision des levées doit fournir un ensemble de paramètres pertinents sur le plan agronomique, pour décrire cette espèce et sa variabilité génétique, ainsi que l'impact de cette diversité sur le résultat des levées dans différentes conditions de semis.

L'objectif de cette démarche est d'identifier des pistes à suivre pour décortiquer le déterminisme génétique de caractères influençant la levée. Les voies proposées pour l'amélioration génétique ou la recherche de marqueurs d'aptitude à germer et à lever des semences, reposeraient sur une analyse des effets des caractéristiques des plantes, sur les résultats des levées.

Un objectif plus général est de contribuer par la démarche entreprise au rapprochement de résultats fragmentaires obtenus par des approches moléculaire, génétique et agronomique sur la germination et la levée.

Nous allons dans un premier temps rappeler le déroulement de l'implantation d'une culture et l'influence sur ces premières phases du cycle des caractéristiques des semences et des génotypes. Nous préciserons comment ces étapes précoces du cycle peuvent être décrites par la modélisation. Puis, nous présenterons plus en détail l'espèce modèle retenue, et les outils de génétique et de génomique disponibles. Enfin, nous récapitulerons la démarche et le plan suivis pour la restitution des travaux menés.

1. Un cadre agro-écophysiologique pour caractériser la germination et la levée d'une plante

1.1 L'implantation d'un peuplement : une étape déterminante du cycle d'une culture

L'implantation correspond aux premières étapes clés du cycle de la culture et son échec représente un risque important pour les agriculteurs, aussi bien en grandes cultures que pour la production de plants d'espèces légumières et horticoles. Les résultats de l'implantation des différentes espèces cultivées sont sujets à une importante variabilité (Awadhwai et Thierstein, 1985; Durrant *et al.* 1988, Benjamin, 1990; Boiffin *et al.*, 1992; Tamet *et al.*, 1996; Klos et Brummer, 2000; Valenciano *et al.*, 2004). La réussite de ces étapes précoces du cycle des cultures met en jeu un ensemble de décisions et d'interventions coûteux en temps, argent et énergie, difficiles à maîtriser et à optimiser parce qu'elles interagissent entre elles.

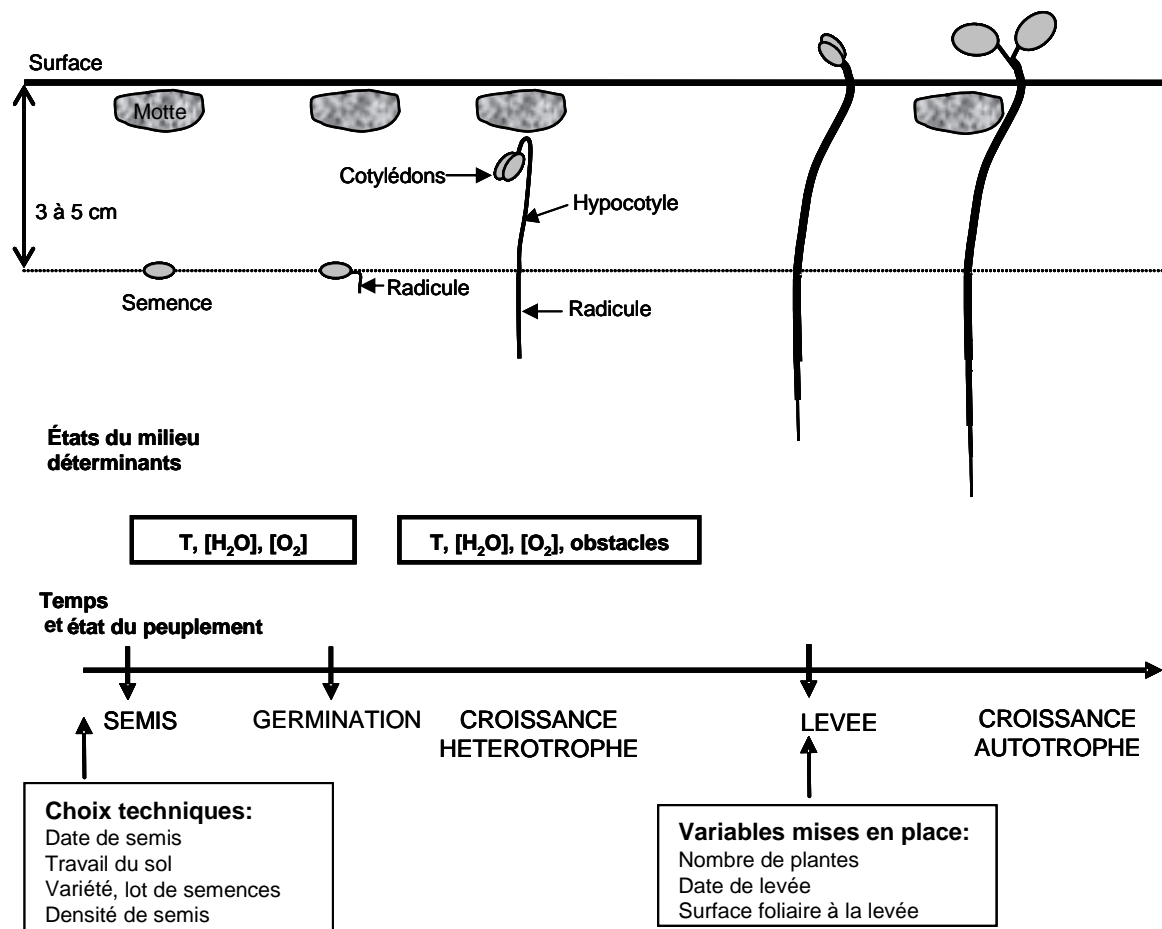


Figure In.1 : Déroulement de l'implantation d'une culture (adapté d'Aubertot, 1998)

Le résultat de l'implantation se caractérise par la vitesse de levée des plantules et le nombre final de plantes levées, la surface foliaire initiale mise en place et la vitesse de croissance des plantes après la levée (Figure In.1). Ces premières étapes influencent la vitesse de la mise en place des organes photosynthétiques, et par conséquent la quantité d'énergie lumineuse interceptée dont dépend la biomasse produite (Milford *et al.*, 1980 ; Gosse *et al.*, 1986). Elles déterminent aussi la taille des plantes récoltées qui constitue pour certaines espèces un critère déterminant de qualité de la production.

La maîtrise du déroulement de l'implantation d'une culture est donc essentielle et s'avère délicate. Elle dépend d'un ensemble de facteurs et conditions du milieu qui interagissent avec les caractéristiques du matériel végétal pour déterminer le résultat au champ. Le choix des différentes techniques d'implantation, des conditions de semis, de la variété et du lot utilisés a une influence importante sur son déroulement. Cependant, il est souvent difficile de faire la part respective des effets dus aux caractéristiques des semences et des variétés, de celle due aux effets des conditions de milieu : température et humidité du lit de semences, pluviométrie, état structural du sol. Pour un meilleur contrôle et une amélioration du déroulement de ces étapes, il est nécessaire d'évaluer et de quantifier les effets respectifs du matériel végétal, des conditions de milieu, et de leurs interactions dans le déroulement des levées.

La sortie de terre d'une plantule viable et apte à une croissance rapide correspond au franchissement de deux étapes successives, i.e. la germination et l'allongement hétérotrophe. La figure In.2 schématise l'évolution de la semence depuis l'imbibition jusqu'à la fin de la croissance hétérotrophe.

Au cours de la germination, la semence s'imbibe. Cette imbibition commence dès qu'elle est placée dans la terre (Figure In.2), à condition que la teneur en eau du sol qui l'environne soit suffisante. L'imbibition de la graine déclenche des modifications hormonales, qui vont aboutir à des réactivations enzymatiques permettant le début de mobilisation des réserves (Le Deunff, 1975 ; Lawrence *et al.*, 1990). Ces processus aboutissent à la **percée de la radicule** hors des téguments, la **graine** est alors **germée** (Bewley et Black, 1994). La figure In.3 décrit les différentes phases menant à la germination d'une graine en fonction de l'absorption d'eau par la graine. L'imbibition dépend de la différence de potentiel hydrique entre la semence et son milieu. L'entrée d'eau peut être décrite à l'aide des équations physiques de diffusion de l'eau, qui se produit en phase liquide et en phase vapeur, en fonction des proportions de surface de la semence en contact avec une phase donnée dans le sol (Bruckler, 1983). Au cours de cette étape de germination, les phénomènes sont réversibles : la graine peut subir des alternances d'humectation et de dessiccation selon les variations de teneur en eau du sol, sans que cela n'altère sa possibilité de germer ultérieurement. La teneur en eau de la graine augmente et doit atteindre une valeur-seuil pour que la graine puisse germer (Figure In.3).

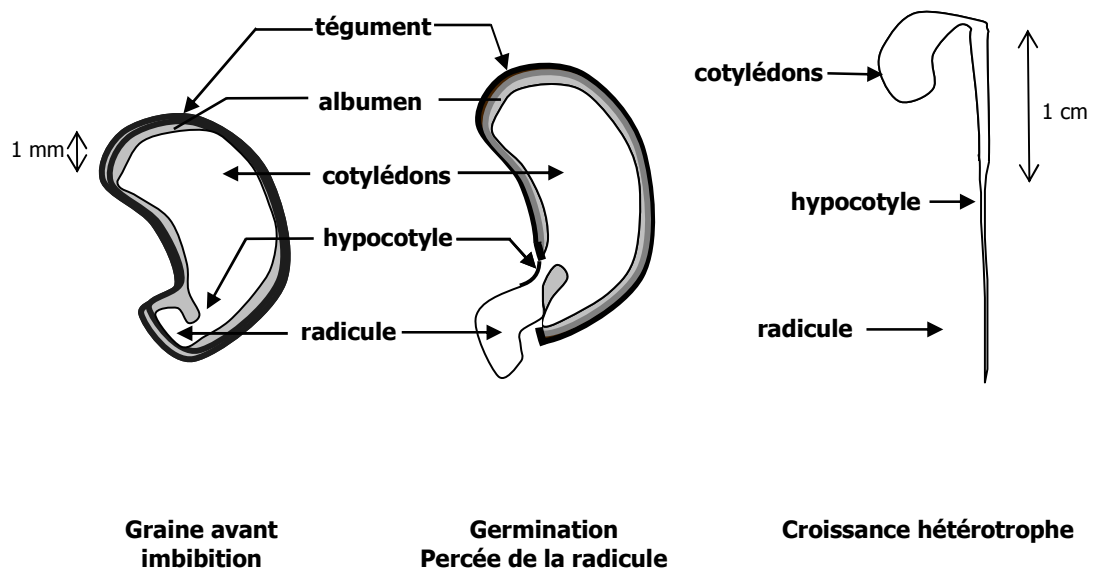


Figure In.2 : Représentation schématique d'une graine de *Medicago truncatula* et de sa plantule au cours de la phase hétérotrophe.

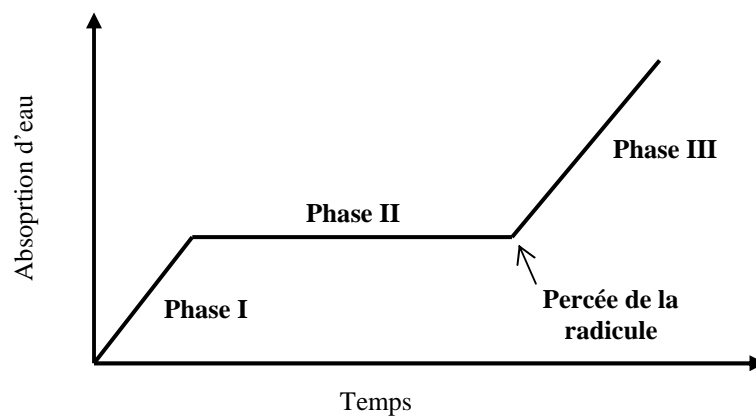


Figure In.3 : Absorption d'eau par la semence au cours de la germination et du début d'allongement de la radicule. Phase I : imbibition. Phase II : reprise de l'activité métabolique et initiation de la croissance, aboutissant à la percée de la radicule au travers du tégument. Phase III : croissance de la radicule.(d'après Bewley et Black, 1994).

Cette teneur dépend des espèces considérées. L'entrée d'eau dans les cellules de l'embryon assure l'augmentation de pression de turgescence qui permet à la racine de percer les téguments. Une fois la graine germée, la racine commence à coloniser le milieu environnant, la teneur en eau marque une nouvelle augmentation (Figure In.3). La seconde étape menant à la levée commence.

Le déroulement des processus menant à la germination est fortement dépendant de la température, de la teneur en eau et en oxygène de l'environnement proche de la semence (Côme, 1975).

La seconde étape correspond à **la croissance hétérotrophe de la plantule¹ sous terre**. Elle est marquée par l'allongement des différents organes de la plantule. Cet allongement permet la colonisation rapide des premiers centimètres du sol par la racine. En condition hétérotrophe, l'allongement maximum de la racine est de quelques centimètres tant que la plantule n'accède pas à la lumière. Ce début de croissance racinaire lui permet de coloniser une partie du sol moins exposée à des fluctuations importantes d'humidité que celle de l'interface sol-atmosphère. La racine y puise l'eau nécessaire à la survie de la plantule. Celle-ci croît sous terre en utilisant des ressources carbonées issues des réserves séminales. L'absorption d'éléments minéraux commence pour un grand nombre d'espèces dès que la racine a percé les téguments (Cooper, 1977 ; Durrant et Mash, 1989 ; Dürr et Mary, 1998). L'allongement de l'épi- ou de l'hypocotyle va permettre la **sortie de la plantule hors de terre**, ce qui définit la **levée d'une plante**. La photosynthèse peut alors commencer, la jeune plante devient autotrophe et peut continuer à croître et développer de nouvelles feuilles et racines, autres que celles préformées dans l'embryon.

Le déroulement de la croissance hétérotrophe, qui correspond à une première colonisation du milieu, dépend des mêmes facteurs que la germination. S'y ajoute le risque de rencontrer des obstacles mécaniques : mottes, horizon compact, croûte à la surface (Arndt, 1965 ; Awadhwai et Thierstein, 1985). Durant cette étape, la plantule est très sensible à ces conditions de milieu car tout dessèchement, température extrême, perturbation de la croissance, peut lui être fatal, contrairement à ce qui se passe pendant la germination. La capacité à franchir les obstacles dépend en grande partie de la pression que peuvent exercer les plantules pour les rompre et/ou les déplacer. La pression dépend de la surface de contact et de la force exercée par la plantule. Celle-ci est très variable et est fortement corrélée à la masse de la semence (Williams, 1956 ; Sinha et Guildyal, 1979).

L'augmentation de la durée de ces deux étapes lorsque les conditions sont défavorables augmente le risque d'attaque par différents bioagresseurs. Leur durée et les conditions dans lesquelles elles se déroulent ont par ailleurs des arrière-effets sur le début de croissance de la jeune plante, entre autre sur sa capacité à réaliser la photosynthèse après émergence et sur la surface des premières feuilles, ainsi que sur la possibilité de développement des premières ramifications (Dürr *et al.*, 1992 ; Doré *et al.*, 1994).

¹ Nous emploierons le terme plantule pour qualifier le stade d'une plante du début de sa germination jusqu'au moment où elle devient autotrophe (Côme et Corbineau, 2006), ce qui correspond à la croissance des organes présents dans l'embryon.

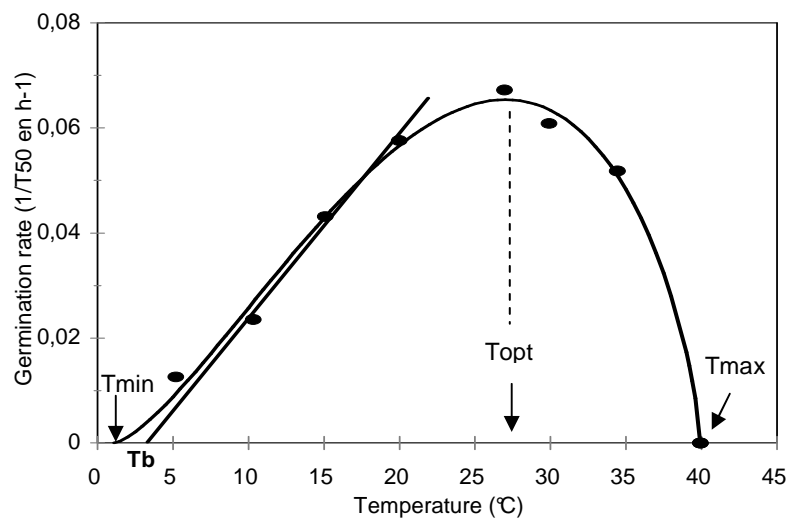


Figure In.4 : Relation entre la température et la vitesse de germination Cas de la moutarde (points : valeurs observées, lignes : ajustements, d'après Dorsainvil, 2002)
 Les températures cardinales sont matérialisées par les flèches (température optimale, T_{opt} , température maximale, T_{max} , température minimale T_{min}). L'intersection entre l'axe des abscisses et la droite suivant l'évolution de la courbe dans sa partie linéaire ascendante permet de déterminer la température de base T_b .

Les réponses de la semence et de la plantule aux facteurs physiques environnementaux sont différentes au cours des deux étapes à franchir. Cela rend nécessaire de bien distinguer ces étapes quand on cherche à caractériser les origines de différences de comportement des plantes. Il est aussi nécessaire d'étudier les facteurs impliqués dans des gammes de variation correspondant à celles d'un semis. Par exemple, les variations de teneur en oxygène affectent la germination des différentes espèces (Côme, 1975 ; Al-Alani *et al.*, 1985). Mais, il a été montré que les variations de teneur en oxygène dans un lit de semences ne peuvent être limitantes pour la germination que dans des conditions extrêmes, peu susceptibles d'être rencontrées sauf dans des conditions de semis très particulières ou sur des pas de temps très courts (Richard et Guérif, 1988).

Les relations entre vitesse de germination ou d'allongement des organes en fonction de la température ont été abondamment étudiées dans la littérature pour de très nombreuses espèces (exemple Figure In.4 ; Bierhuizen et Wagenwort, 1974; Covell *et al.*, 1986 ; Fyfield et Gregory, 1989 ; Marshall et Squire, 1996 ; Squire, 1999). A partir de ces résultats, on peut déterminer les températures cardinales minimale, optimale et maximale. La détermination de la température de base T_b utilisée dans le calcul de somme de temps thermique prend seulement en compte la partie linéaire ascendante de la réponse à la température. La T_b correspond à l'intersection de la courbe de réponse avec l'axe des abscisses et correspond donc à la valeur ajustée mathématiquement pour laquelle la vitesse est nulle (Gummerson, 1986 ; Dahal et Bradford, 1994).

Les effets des variations de potentiel hydrique sur la germination ont été peu étudiés et encore moins sur l'allongement, en raison de plusieurs difficultés expérimentales. Tout d'abord, il est moins aisé de faire varier de façon contrôlée le potentiel hydrique que la température. Dans le cas de la germination, les expérimentations restent cependant relativement simples à mettre en place. Comme pour la température, il est possible de déterminer une valeur seuil pour laquelle la vitesse de germination s'annule, c'est-à-dire le potentiel hydrique de base de germination Ψ_{bgerm} (Gummerson, 1986).

Lorsque les organes s'allongent, le volume du milieu colonisé augmente. Le potentiel hydrique des différentes couches traversées peut varier et les différents organes seront confrontés à différents potentiels. Des phénomènes de compensation peuvent se mettre en place entre parties de la plante, soumises ou non au stress. Les travaux concernant cet aspect au stade plantule sont rares (Bouaziz et Bruckler, 1989 a, b et c). Ils montrent que l'allongement des racines est nettement plus affecté que la croissance du coléoptile et des premières feuilles.

D'une manière générale, les travaux relatés dans la littérature sont plus abondants sur la germination que sur la croissance hétérotrophe. Cependant, les diagnostics agronomiques qui ont été réalisés au champ sur différentes cultures (Boiffin *et al.*, 1992 ; Dorsainvil *et al.*, 2005, Moreau-Valancogne *et al.*, 2008), laissent penser qu'il y aurait à développer davantage les travaux portant sur la croissance de la plantule après germination jusqu'au début de la photosynthèse. L'élimination des problèmes de germination par une très sévère sélection des lots commercialisés aboutit en effet à la persistance de problèmes importants de levée, alors même que l'étape de germination (radicule percée) est franchie dans une très large gamme de conditions de milieu.

1.2. Influence des génotypes et des caractéristiques des semences sur le déroulement de la germination et de la levée

La distinction entre les effets génotypiques et les effets des caractéristiques des graines n'est pas aisée, car les caractéristiques des graines sont elles-mêmes dépendantes d'effets génétiques et d'effets liés aux conditions de leur production. Nous allons cependant tenter de sérier ces différents effets.

1.2.1. Effet des génotypes

La sélection des variétés ne se fait pas prioritairement sur des critères de réussite des levées. Les problèmes de germination et de levée sont plutôt des critères éliminatoires au cours ou en phase finale de sélection (Spear et Fehr, 2007). De nombreux résultats portent cependant sur des essais réalisés au champ comparant les levées de différents génotypes (Nafziger *et al.*, 1991 ; Sinclair *et al.*, 2005) . Les résultats obtenus sont très variables en fonction des conditions de milieu, mais montrent l'existence d'effets génotypiques pour différentes espèces, en particulier concernant la tolérance à différents stress (Hampton, 1981 ; Bishnoi *et al.*, 1997). Le plus souvent, il reste toutefois difficile de préciser les étapes concernées, la façon dont le stress s'exerce et les mécanismes en cause.

Un autre aspect de l'effet génotypique sur les levées est que certains caractères sélectionnés pour améliorer la production de la culture, peuvent avoir des conséquences indirectes sur le déroulement de la levée. Par exemple, l'amélioration du rendement du blé et du riz est largement due à un important raccourcissement des pailles qui favorise la résistance à la verse (Begonia et Begonia, 2007). Cette sélection modifiant la hauteur de paille a conduit à la sélection de gènes de nanisme, qui pour certains réduisent aussi l'allongement du coléoptile du blé (Botwright *et al.*, 2001 ; Rebetzke *et al.*, 2007). Ces gènes induisent une absence de sensibilité à la gibbérelline et une réduction de l'allongement cellulaire.

Dans le cas de la betterave, le niveau de ploïdie a varié au cours du temps avec le mode de sélection (Nakamura *et al.*, 1991). Le niveau de ploïdie influence la taille des cellules, et donc le volume des organes récoltés (racine tubérisée), mais aussi ceux de la plantule et en particulier celui de son hypocotyle (Dhellemmes, 2002), modifiant ainsi potentiellement la force et la pression exercée par la plantule. La tolérance à différents pathogènes est aussi un critère de sélection très important. Les travaux de sélection pour la tolérance à la rhizomanie, maladie virale de la racine de betterave, ont abouti à favoriser le développement de variétés diploïdes, mais ils ont aussi conduit à la modification de la capacité d'absorption précoce d'éléments minéraux pour certains génotypes et à un ralentissement du début de croissance des plantules (Dürr *et al.*, 2000).

Enfin, dans le cas où les organes récoltés sont des graines, la masse et la composition des réserves de ces graines sont des caractéristiques qui font l'objet d'une très forte sélection, car elles influencent de manière déterminante la biomasse produite par une culture et sa qualité. Ces caractéristiques peuvent avoir des répercussions sur le comportement à la levée de ces mêmes graines. Elles sont d'ailleurs très fréquemment suggérées comme étant des caractéristiques majeures à l'origine de ces variations. Il est donc important de récapituler les effets connus de ces caractéristiques sur le comportement à la levée.

1.2.2. Variations liées à la masse et/ou à la taille des semences

La masse et la taille des graines varient très largement à la fois entre espèces et à l'intérieur d'une espèce selon le type de floraison et d'inflorescence (e.g. Gray et Steckel, 1983), le nombre et l'étalement des âges de ramification de la plante (e.g. Coste *et al.*, 2002), le génotype (Ohto *et al.*, 2007), et les conditions de production des semences (e.g. Fougereux, 1994). Les variations de masse sont corrélées aux variations de plusieurs variables relatives aux phases allant de la germination jusqu'à la sortie de la plantule hors de terre. Le sens des corrélations avec ces variables n'est pas toujours le même selon les variables considérées, ce que l'on peut rapprocher du fait que les variations de la masse peuvent avoir plusieurs origines. Par ailleurs, masse des réserves et taille de l'embryon peuvent varier simultanément, ce qui peut compliquer l'analyse des résultats et l'identification des mécanismes sous-jacents.

Les variations de vitesse d'imbibition, et de vitesse de germination peuvent être corrélées aux variations de la masse de la graine, sans que le sens de variation trouvé ne soit toujours le même (Tekrony *et al.*, 1987 ; Schneider, 1998 ; Wang *et al.*, 2004 ; Mazibuko et Modi, 2005 ; Pascualides et Planchuelo, 2007). Par ailleurs, la vitesse d'allongement peut être positivement corrélée à la vitesse de germination (Dürr *et al.*, 2001), mais peu de travaux ont établi de telles relations.

La longueur finale atteinte par les organes peut être positivement corrélée à la masse de la graine (Tamet *et al.*, 1996), mais ce n'est pas toujours le cas (Dürr et Boiffin, 1995). Une telle relation est souvent attribuée aux effets de la masse des réserves disponibles pour alimenter la croissance de la plantule. Cependant, la taille de l'embryon est aussi variable et modifie la taille potentielle de la jeune plantule hétérotrophe. Des travaux réalisés sur le blé ont montré qu'en amputant une certaine masse de réserves sans toucher l'embryon, la croissance de la plantule n'est pas modifiée (Pinto Contreras et Gaudillère, 1987). Enfin, nous avons déjà souligné que la force exercée par la plantule est corrélée à la masse de la graine (Williams, 1956 ; Sinha et Guildyal, 1979), sans toutefois que le mécanisme ne soit élucidé.

1.2.3. Variations liées à la composition de la semence

Les principaux constituants des réserves des graines sont les hydrates de carbone (amidon et sucres solubles), les protéines et les lipides. Les proportions de ces différents composants varient selon les grands groupes d'espèces (Bewley et Black, 1994; Copeland et Mc Donald, 2001). La sélection peut viser à augmenter ou réduire les proportions de certains composants : par exemple augmentation de teneurs en protéines (Krochko et Bewley, 2000), modification des profils lipidiques (colza, lin), réduction des teneurs en certains sucres solubles diminuant la digestibilité (légumineuses à graines ; Hitz *et al.*, 2002). L'influence de ces types de réserves et de leurs modifications sur les caractéristiques de la germination et de la croissance hétérotrophe est toutefois loin d'être établie, même si elle est très souvent suggérée. En particulier, une teneur importante en sucres solubles, rapidement disponibles, serait un critère favorable à une germination rapide (Ziegler, 1995 ; Bailly *et al.*, 2001), sans cependant que cela n'ait clairement été démontré (Kuo *et al.*, 1988). Raymond *et al.* (1985) ont démontré que les graines à teneur totale élevée en lipides ont une germination plus lente que les semences à réserves amylacées face à une faible teneur en O₂ du milieu.

Hormis les constituants de réserve, les études portent sur de nombreux composés présents en plus faible quantité, étant donné leur rôle dans le métabolisme général. Dans certains cas, ils sont étudiés en tant que marqueurs potentiels de la capacité à germer. On peut citer de façon non exhaustive différentes protéines aux rôles variés (facteurs de transcription, enzyme, agent protecteur ; Bettey et Finch-Savage, 1998 ; de los Reyes *et al.*, 2003 ; Zhu et Chen, 2007) ou encore des co-facteurs impliqués dans des processus métaboliques (par exemple, vitamine B1, Neumann *et al.*, 1999). Certains de ces composés se sont révélés être des marqueurs d'aptitude à une germination rapide ou encore des marqueurs d'aptitude à la conservation (SBP65, Dehaye *et al.*, 1997 ; ROS, Bailly, 2004 ; EM6, Sator *et al.*, 2008). Ces travaux portent toutefois encore souvent sur des modèles de laboratoire (semences primées ou semences vieillies artificiellement) et leur valeur indicatrice peut être limitée à certaines espèces. Ces marqueurs potentiels ne sont encore que rarement validés sur des lots de semences produits en conditions variées et sur différents génotypes.

De nombreuses études au niveau biochimique et moléculaire testent des pistes métaboliques qui seraient à l'origine de différences de tolérance à différents stress (tolérance au stress hydrique et thermique, Stupnikova *et al.*, 2006 ; Boudet *et al.*, 2006 ; Nakamoto et Vigh, 2007 ; Tolleter *et al.*, 2007). Généralement, ces travaux n'abordent pas la variabilité génétique d'expression des gènes sous jacents.

1.2.4. Méthodes d'évaluation des effets des caractéristiques des semences sur la levée

De nombreux travaux portent sur la qualité des semences et sur les critères qui l'évaluent, y compris en terme d'effets potentiels sur la levée. Les semences font l'objet d'une très forte sélection lors de leur production et avant leur distribution. Un grand nombre de lots sont éliminés ce qui augmente les coûts de production. Les critères utilisés pour leur tri sont en premier lieu des critères physiques. Le tri sur la taille ou la masse permet d'éliminer les graines avortées ou de très petites tailles. Différents tests sont par ailleurs pratiqués afin de retenir des lots à fort potentiel germinatif. Le seul test obligatoire évaluant ce potentiel, dans le cadre de la certification pour la vente des semences de certaines espèces, est celui de la faculté germinative, qui donne le taux de plantules normales obtenu en conditions de germination optimales pour l'espèce (ISTA², 2007). Différents tests sont pratiqués en complément, dans certains cas, pour évaluer les risques potentiels de mauvaise levée en conditions difficiles : test au froid, mesure de conductivité, détérioration contrôlée sont les plus fréquents. Ces mesures ne sont que des indicateurs de l'état des semences, qui ne sont pas toujours bien corrélés à une aptitude à lever au champ (Kulik et Yaklich, 1982 ; Larsen *et al.*, 1998 ; Kolasinska *et al.*, 2000). Les corrélations obtenues avec des taux de levée au champ sont très variables, puisque les conditions de milieu provoquant des difficultés de levée sont elles-mêmes très variables (Kolasinska *et al.*, 2000). Ces différents tests ne se révèlent donc pas toujours performants. De nombreuses recherches portent sur des marqueurs de qualité des semences évoquées au paragraphe précédent. Toutefois, ces marqueurs restent pour le moment très partiels : marqueur de priming et par extension de rapidité de germination. Jusqu'à récemment, les méthodes moléculaires se sont développées essentiellement dans le domaine de la détection de pathogènes infectant les semences (e.g. Kerkoud *et al.*, 2007). Il s'agit aussi d'un critère de qualité important conduisant à l'élimination des lots.

En résumé, il existe une multitude de travaux sur les semences, en particulier parce que les semences sont des modèles de laboratoire faciles à utiliser pour l'étude de nombreuses voies métaboliques. Mais, il n'est pas aisé de rassembler les connaissances acquises, car elles ne sont pas toujours adressées spécifiquement à l'étude des caractéristiques de semences en relation avec le déroulement de la germination et de la croissance hétérotrophe.

² ISTA International Seed Testing Association

Lorsqu'elles le sont, les études au niveau moléculaire restent fragmentaires, même si les progrès des outils en génomique, protéomique, métabolomique font que les données disponibles s'amplifient (par exemple Gallardo *et al.*, 2007a ; Rajjou *et al.*, 2008) et elles n'abordent pas souvent les différences dues à la variabilité génétique.

2. Apport de la modélisation pour l'étude de la germination et de la levée d'une espèce

2.1. Objectifs des modèles agro-écophysiologiques

Les modèles écophysiologiques reposent sur l'analyse du développement et de la croissance d'une plante en fonction des facteurs du milieu. L'apparition de nouveaux organes est liée à une régulation d'origine endogène ou programmation génétique modulée par des facteurs environnementaux, i.e. lumière, photopériodisme, température. La croissance est sous le contrôle de facteurs trophiques, i.e. lumière, température, teneur en eau et disponibilité en éléments minéraux (Leclerc 1999 ; Doré *et al.*, 2006). Dans ce contexte, les modèles permettent de rassembler les connaissances acquises, de les mettre en forme en (1) distinguant les étapes, (2) définissant l'échelle à laquelle on considère les processus et en donnant de ces processus une représentation plus ou moins élaborée, (3) hiérarchisant les facteurs environnementaux dont on souhaite représenter l'influence.

Les modèles écophysiologiques permettent d'identifier des paramètres caractéristiques de la plante, qui sont impliqués dans ses réponses comportementales en fonction de facteurs environnementaux. Ces modèles permettent en outre de représenter les interactions entre facteurs et entre étapes successives. Le modèle introduit un formalisme pour la description du développement et de la croissance sous l'effet de facteurs environnementaux. Ce formalisme est nécessaire pour permettre des comparaisons, par exemple de cinétiques d'apparition, ou d'allongement d'organes (Assuero *et al.*, 2004 ; Bouchabké *et al.*, 2006 ; Moreau *et al.*, 2006) ou encore de germination et croissance de la plantule (Dürr *et al.*, 2001 ; Rowse et Finch-Savage, 2003), indépendamment de la température grâce à l'expression du temps en somme de temps thermique. Intégrant des équations associées à ce formalisme, le modèle permet de prédire un déroulement chronologique des étapes, ce qui apporte un réel avantage pour simuler le comportement de l'espèce dans des conditions environnementales variées.

Les paramètres d'un modèle écophysiologique sont caractéristiques de la plante, indépendants des facteurs environnementaux (e.g. température de base, efficacité d'interception de l'énergie lumineuse). Pour une espèce donnée, leur valeur peut aussi dépendre du génotype (Quilot *et al.*, 2005a). En intégrant l'influence des facteurs environnementaux dans la prévision de variables d'intérêt (e.g. cinétique de germination et de levée, surface foliaire, biomasse produite), on peut décrire le comportement d'un génotype dans des conditions environnementales variées.

Le modèle permet donc de relier les variations d'un ou plusieurs facteurs environnementaux avec la morphogénèse et la croissance végétale à plusieurs échelles : organe ou plante isolée puis éventuellement peuplement ou culture. La dimension agronomique à cette étape doit intégrer l'analyse des effets des pratiques culturales sur les facteurs environnementaux. La maîtrise des itinéraires techniques repose sur la possibilité d'établir de telles relations. Le modèle peut alors devenir un outil d'aide à la décision aux objectifs variés, e.g. évaluation des risques liés à une date de semis pour optimiser l'implantation (Carrera et Dürr, 2003 ; Moreau-Valancogne *et al.* 2008), évaluation des risques de levées d'adventices ou encore de flux de gènes en fonction des systèmes de culture (Colbach *et al.*, 2006, 2008 ; Garnier et Lecomte, 2006) ou choix d'une variété adaptée à des conditions environnementales et des itinéraires techniques (Vocanson *et al.*, 2006, 2008). En paramétrant le modèle avec des valeurs caractéristiques de l'espèce ou de la variété, un modèle agro-écophysiologique peut rendre compte de variations de comportements des plantes en fonction des pratiques culturales et des conditions environnementales. Un des intérêts d'un modèle prédictif est donc de pouvoir réaliser des expérimentations numériques complémentaires ou se substituant à des expérimentations de terrains lourdes à mener.

En résumé, les modèles agro-écophysiologiques décrivent et peuvent prédire l'évolution d'un individu dans son milieu ou d'un peuplement sur une saison ou sur plusieurs années, en fonction d'un ou plusieurs facteurs environnementaux. Actuellement, le développement de modèles agro-écophysiologiques vise à intégrer des effets jusqu'alors peu ou non pris en compte pour la prédiction du comportement de la culture au cours de son cycle :

- les interactions Génotype x Environnement à l'origine de la variabilité de caractères d'intérêt, sont reconnus actuellement comme un enjeu majeur, tant par les généticiens que par les agronomes et écophysiologistes. Aussi, l'identification et l'analyse de ces interactions, doit permettre de les modéliser (Epinat-Le Signor *et al.*, 2001) ;

- les effets de combinaisons alléliques sur les valeurs de paramètres caractéristiques des plantes dans le modèle (orge, Yin *et al.*, 2000, 2003 ; maïs, Reymond *et al.*, 2003; riz, Zhang *et al.*, 2005 ; blé, Laperche *et al.*, 2006). La méthode consiste à prévoir les valeurs de ces paramètres, caractéristiques du génotype, à partir de la somme des effets pondérés des QTL impliqués dans la variation de ces paramètres. A partir de ces nouvelles valeurs, il est possible de simuler le comportement d'idéotypes³, caractérisés uniquement par leurs allèles, dans une large gamme de conditions pédoclimatiques (Tardieu *et al.*, 2005).

Le modèle contribue aussi à guider la conception de méthodes et d'outils de phénotypage, en particulier face à de telles perspectives.

³ Un idéotype est généralement un génotype virtuel pour lequel des caractères favorables à l'amélioration du potentiel génétique ont été regroupés (Rasmusson, 1987). Cette notion d'idéotype, ou encore de génotype idéal, est utilisée en modélisation, lorsque l'on cherche à évaluer les effets de valeurs de paramètres caractérisant de tels génotypes virtuels (capacité d'absorption d'azote chez le pois, Voisin *et al.*, 2007 ; contrôle de la surface foliaire chez l'orge, Yin *et al.*, 1999 ; adaptation au déficit azoté chez le blé, Laperche *et al.*, 2006).

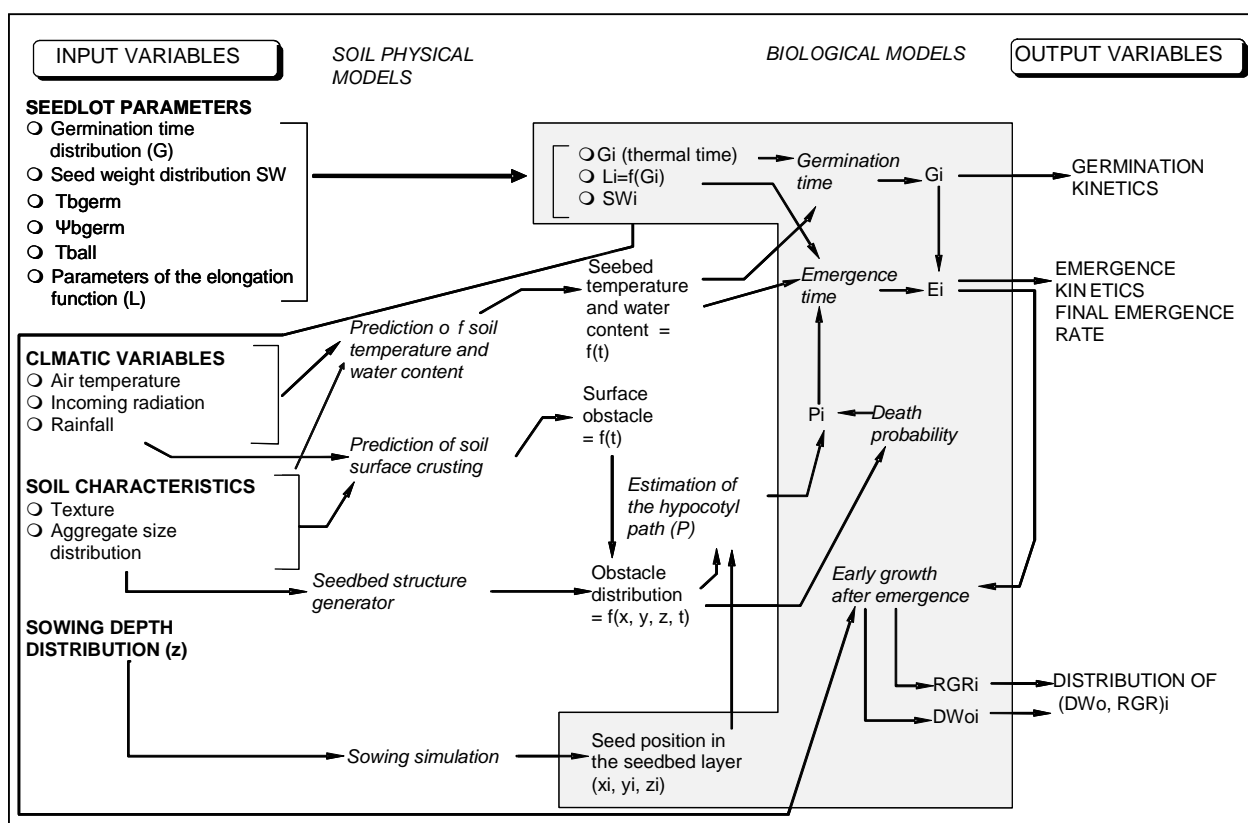


Figure In.5: Schéma du fonctionnement de SIMPLE (d'après Dürr *et al.*, 2001)

Le modèle procède semence par semence. Les simulations sont répétées n fois (= répétition des calculs situés dans la partie grisée du schéma) pour obtenir la simulation d'une cinétique de levée sur n individus. Les caractéristiques de chaque individu i sont tirées au sort à chaque simulation dans différentes distributions (position dans l'espace de la semence i dont sa profondeur de semis, temps thermique nécessaire pour germer, possibilité de contourner des obstacles et de franchir une croûte). Le modèle fonctionne avec un pas de temps journalier.

2.2. Le modèle de prévision des levées SIMPLE

Plusieurs modèles ont été développés pour prévoir la germination et la levée, en intégrant l'effet de différents facteurs environnementaux (blé en conditions arides Bouaziz et Bruckler, 1989 ; cultures tropicales Mullins *et al.*, 1996 ; cultures légumières Finch-Savage *et al.*, 1998 ; grandes cultures Dürr *et al.*, 2001). Plus récemment, des modèles ont été établis pour prévoir la levée des adventices selon les systèmes de cultures (Colbach *et al.*, 2006).

De façon générale, dans ces différents modèles de levée, les effets de la température et de la teneur en eau sur la cinétique de germination et de levée sont représentés parce que ce sont eux qui gouvernent en premier lieu les cinétiques que l'on cherche à prévoir. Les variations de position des semences dans les horizons du sol sont également le plus souvent prises en compte. Ces modèles permettent donc le plus souvent une prévision dynamique de la germination et de la levée, prenant en compte la position de la semence et les évolutions de la température et de la teneur en eau du sol.

Parmi les modèles de levée évoqués, le modèle SIMPLE (Dürr *et al.*, 2001) présente la spécificité d'intégrer les effets des techniques de travail du sol et de semis sur les conditions dans le lit de semences, en particulier son état structural, pour prévoir la germination, la levée et les paramètres de début de croissance des plantules. Le modèle comporte aussi un module prévoyant la dégradation de la surface sous l'action des pluies et l'effet d'obstacle que les croûtes formées peuvent provoquer sur les levées des plantules.

Ce modèle fournit un cadre synthétique d'analyse des étapes de germination – levée. La forme générale des équations retenues pour décrire un processus ne change pas selon l'espèce, le génotype, le lot de semences : ce sont les paramètres, qui peuvent varier et qui sont à mesurer pour caractériser le matériel végétal. Le modèle SIMPLE étant utilisé dans les travaux présentés, il est nécessaire de préciser les grands principes de son fonctionnement (Figure In.5). Le détail complet de ce fonctionnement est décrit dans Dürr *et al.* (2001) et dans la notice d'utilisation du logiciel Win SIMPLE (2003). Une liste des principales équations permettant de prévoir la germination et la levée est présentée au tableau In.1. Les variables d'entrée du modèle sont de trois grands types :

- les conditions climatiques (température dans le lit de semences, humidité du lit de semences, pluviométrie) ;
- la structure du sol et le placement des semences liées aux opérations de travail du sol et de semis (taille et répartition spatiale des mottes dans le lit de semences, répartition spatiale des graines dont profondeur de semis) ;
- un ensemble de caractéristiques décrivant les semences et plantules du lot de semences et/ou de la variété de l'espèce étudiée.

Etape	Equations et conditions	Paramètres d'entrée
Semis-Germination	$TT_{ij} = \sum_{i=1}^n \left[(T_j - T_{bgerm}) I_{ \Psi_{ji} - \Psi_b } \right]$ <p>avec $I_{ \Psi_{ji} - \Psi_b } = 1$ si $(\Psi_{ji} > \Psi_b)$</p> <p>et $I_{ \Psi_{ji} - \Psi_b } = 0$ sinon</p>	<p>TT_{ij} donne le calcul simplifié du temps hydrothermique cumulé au jour j pour la graine i</p> <p>T_j, Ψ_{ji}: température et potentiel hydrique à la profondeur de semis de la graine i au jour j</p> <p>T_{bgerm} et Ψ_b: Température et Potentiel hydrique de base.</p> <p>TT_i (°Cj): temps thermique cumulé requis pour la germination de la graine i. Chaque lot de graines a une distribution de TT_{ij} qui le caractérise.</p>
Germination-Levée	$l(t) = a \left\{ 1 - \exp \left[- \left(b \cdot \sum (T - T_{ball}) \right)^c \right] \right\}$ $P_i = 0 \text{ si } L < L_0$ $P_i = 100(1 - \exp[-\alpha(L - L_0)])$ $\text{si } L \geq L_0$	<p>$l(t)$: longueur d'hypocotyle au temps t après germination. Paramètres de la fonction d'élongation d'hypocotyle (Weibull) : a (longueur maximale) ; b_{elon} et c_{elon}, paramètres de forme de la courbe</p> <p>T_{ball} : température de base d'allongement</p> <p>P_i: probabilité de la plantule i de rester bloquée sous une motte de diamètre L.</p> <p>L_0 la longueur de la motte au-delà de laquelle la plantule ne peut pas la déplacer et a, un coefficient prenant en compte le diamètre de la cavité et sa densité.</p> <p>Les valeurs des paramètres α (mm⁻¹), L_0 (mm) sont déterminées pour des mottes posées en surface et des mottes enfouies.</p>
Franchissement de la surface	<p>Etat de la surface le jour j</p> <ul style="list-style-type: none"> - présence d'une croûte à la surface si la quantité de pluie cumulée depuis le semis (CR) ou si la quantité journalière de pluie sont au dessus d'une valeur seuil (DR1) - la croûte est sèche s'il n'y a pas eu au moins une pluie dépassant la valeur seuil (DR2) dans les 3 jours précédents le jour j <p>La probabilité (p) qu'une plantule franchisse une croûte sèche est fonction de l'espèce.</p>	<p>CR</p> <p>DR₁</p> <p>DR₂</p> <p>$p = 1$ pour une croûte humide</p> <p>$p < 1$ pour une croûte sèche</p>

Tableau In.1: Equations et variables d'entrée utilisées pour modéliser la germination et la levée dans le modèle SIMPLE (d'après Dorsainvil *et al.*, 2005).

A l'aide des variables d'entrée qui lui sont fournies, SIMPLE produit une représentation numérique du lit de semences sous la forme d'une maquette 3D. Les variables d'entrée pour le générateur de maquettes 3D sont le nombre, la taille, la forme et organisation spatiale de mottes. La température et le potentiel hydrique des premières couches du sol, sont également des variables d'entrée caractérisant les conditions de milieu, à pas de temps journalier, pour les simulations.

La simulation est réalisée pour chaque semence i . Le temps nécessaire à la germination de la graine i est tiré au sort dans la distribution des temps thermiques nécessaire pour germer qui caractérise le lot de semences utilisé. La profondeur de semis de cette semence i est tirée au hasard dans la distribution des profondeurs de semis, donnée elle aussi en variable d'entrée. Le modèle calcule si et quand les semences germent en tenant compte de la température du sol et du potentiel hydrique à la profondeur de semis (temps hydro-thermique). Ce calcul intègre aussi le potentiel hydrique seuil de base en-dessous duquel la semence ne germe pas. Si la semence i considérée est placée dans un horizon pour lequel le jour j le potentiel hydrique du sol est plus faible que la valeur seuil du potentiel hydrique de base pour la germination, alors la sommation du temps thermique (en degrés-jours, °Cd) s'interrompt, ce qui ralentit le déroulement du processus de germination.

Ensuite, si la graine est germée, la trajectoire et la longueur du parcours de la plantule dans le lit de semences jusqu'à la surface sont calculées en fonction de la position de chaque graine et des mottes rencontrées sur son chemin. Le temps qu'il faut pour atteindre la surface dépend des paramètres de la fonction d'allongement. Dans cette fonction, le temps est exprimé en temps thermique cumulé depuis la germination, en utilisant la température de base propre à l'allongement, lorsque celle-ci est différente de celle de la germination. Une plantule peut également rester coincée sous une motte et ne jamais sortir de terre, avec une probabilité qui dépend de l'espèce, de la taille et de la position de cette motte dans le lit de semences.

Enfin, au moment de franchir la surface du sol, la plante peut rester bloquée s'il y a une croûte qui s'est formée depuis le semis. Le modèle intègre un module empirique de formation des croûtes conçu sur la base d'observations réalisées sur un large réseau de parcelles, en sol limono argileux (Duval et Boiffin, 1994). L'état de la surface est déterminé jour après jour, à partir du jour du semis. Il dépend de la pluviométrie *via* deux variables, qui sont la quantité de pluie cumulée depuis le semis et les pluies journalières. Lorsqu'une de ces deux variables excède une valeur seuil, le modèle décrète la formation d'une croûte à la surface du lit de semences. Cette croûte est considérée comme un obstacle si elle est sèche, c'est-à-dire si la pluie journalière dans les jours précédents le jour où l'on examine l'état de la surface est inférieure à une valeur seuil. Cette dernière est établie empiriquement dans le réseau de parcelles observé et dépend en particulier de l'évaporation au niveau du sol.

Face à une croûte sèche, une proportion des plantules ayant atteint la surface du sol reste bloquée, les autres parviennent à émerger. Cette proportion dépend des caractéristiques des semences considérées. Le même processus d'évaluation de l'état de la surface est réitéré jour après jour, tant que le temps thermique cumulé depuis la germination n'excède pas la durée maximale de vie hétérotrophe des plantules sous terre. Le module levée sous croûte a été modifié pour devenir moins empirique et adaptable à un plus grand nombre de sols, climats et espèces (Gallardo-Carrera *et al.*, 2007). Dans ce nouveau module, les effets des états initiaux des lits de semences (structure et teneur en eau) sont intégrés et modulent les cumuls de pluie aboutissant à la formation de stades successifs de la croûte en surface (structurale à sédimentaire, Boiffin, 1984). A chaque type de croûte est affectée une distribution caractéristique de résistances mécaniques. Les plantes sont caractérisées par une distribution des forces qu'elles peuvent exercer, qui diminue avec leur âge (durée de vie hétérotrophe après germination). La force d'émergence de la plantule i est tirée au sort dans cette distribution. Cette valeur est confrontée, jour après jour, à la résistance du matériau (i.e. la croûte), *via* un coefficient k qui permet de déterminer si la plantule reste bloquée ou si elle passe à travers. Ce coefficient est issu d'un ajustement aux données observées et a été établi pour la betterave en raison d'un grand nombre d'observations de terrain disponible. Ce nouveau module n'est toutefois pas encore intégré dans le logiciel et fonctionne uniquement sous Matlab, ce qui limite la convivialité et la possibilité de réaliser les simulations en série.

Les simulations sont réitérées sur un nombre n de semences i (en général de l'ordre d'un millier) pour obtenir la prévision des cinétiques et taux finaux de germination et d'émergence. Le modèle est stochastique : les valeurs des paramètres affectés aux semences et plantules en particulier, sont tirées au sort dans des distributions, ce qui permet de représenter une partie de la variabilité des caractéristiques des semences au sein d'un même lot. La constitution des maquettes et le placement des semences sont aussi des composantes stochastiques du modèle. Le pas de temps des prévisions est journalier.

Le modèle se présente sous la forme d'un logiciel WinSIMPLE (2003), programmé en C (Borland, version 5.0) et doté d'une interface bâtie en C++ Builder, permettant l'appel des différents fichiers, climatiques en particulier, nécessaires pour des réalisations de simulations en séries. Le modèle est connecté en amont avec les sorties d'autres modèles qui fournissent la température et la teneur en eau dans le sol à l'aide de données climatiques, en tenant compte des caractéristiques du sol (TEC, Witono et Bruckler, 1989 ; STICS, Brisson *et al.*, 1998). Le temps de calcul pour réaliser une simulation est de quelques secondes pour représenter 1000 individus.

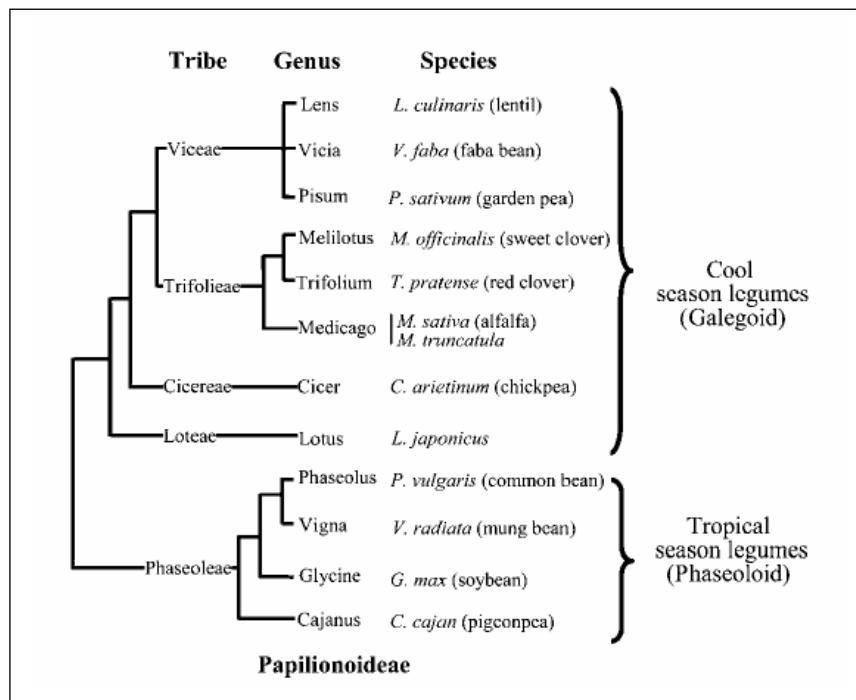


Figure In.6 : Relations phylogéniques chez les Papillonacées.

Les deux principaux groupes d'espèces cultivées font partie des Phaséolides et des Galégoides (d'après Choi *et al.*, 2004, Doyle et Luckow 2003, Zhu *et al.*, 2005)

Les maquettes peuvent être stockées dans une mini-base de connaissances et être à disposition pour réaliser des simulations sous différents climats par exemple ou pour différents géotypes.

Le modèle a été paramétré pour prévoir les levées de plusieurs espèces (betterave, moutarde, lin, haricot) et restitue de façon satisfaisante le processus de levée des plantes dans une large gamme de conditions. Les expérimentations et les méthodes de calcul pour déterminer les valeurs des différents paramètres des équations (Tableau In.1) sont décrites plus en détail dans le chapitre I, lors de leur mise en œuvre pour paramétrer *M.tr.*.

3. *Medicago truncatula*, l'espèce modèle retenue pour la caractérisation écophysologique de la germination et de la croissance hétérotrophe

Les étapes de germination et de croissance hétérotrophe précédemment décrites vont être étudiées sur la Légumineuse modèle *Medicago truncatula* (*M.tr.*), en fonction de facteurs environnementaux majeurs lors de l'implantation d'une culture. Nous allons présenter brièvement les caractéristiques de cette famille botanique d'intérêt agronomique et de l'espèce modèle retenue pour la représenter, ainsi que les outils de génétique et de génomique disponibles qui lui sont associés et qui rendent possible des analyses de déterminisme génétique.

3.1. *Medicago truncatula*, plante modèle de la famille des Légumineuses

3.1.1. Intérêt agronomique de la famille des Légumineuses

Les Légumineuses comptent plus de 14000 espèces, réparties en 3 sous-familles : les Césalpiniées, les Mimosacées et les Papillonacées. Elles ont colonisé des biotopes variés sur tous les continents. Les Légumineuses cultivées appartiennent aux Papillonacées et se répartissent majoritairement sur deux clades : les Phaseolides, d'origine tropicale (e.g. le soja *Glycine max*, le haricot commun *Phaseolus vulgaris*, le haricot mungo *Vigna radiata*) et les Galégoïdes d'origine tempérée (e.g. le pois *Pisum sativum*, la lentille *Lens culinaris*, la luzerne cultivée *Medicago sativa*, la luzerne sauvage *Medicago truncatula* ;Figure In.6).

Parmi les Légumineuses cultivées, on distingue les Légumineuses fourragères et les Légumineuses à graines, utilisées dans l'alimentation humaine et animale essentiellement. Elles présentent de nombreux atouts environnementaux (e.g. diminution de la fertilisation azotée, diversification dans les rotations agricoles prévenant le développement des adventices et parasites) et des qualités nutritionnelles. Cependant, la production des légumineuses ne représente que 5% des surfaces allouées aux grandes cultures en Europe. A titre de comparaison, cette part est traditionnellement de 15 à 30% aux Etats-Unis, en Chine et dans de nombreux autres pays agricoles. En ce qui concerne la culture de *M.tr.* en France, elle est relativement anecdotique : une seule variété

Tribu	Genre	Espèce	Nombre chromosomes	Taille génome (Mb/1C)	Auto-compatibilité
Trifolieae	Medicago	<i>M. truncatula</i>	2n=2x=16	466	Autogame
		<i>M. sativa</i> (luzerne cultivée)	2n=4x=32	1715	Allogame
	Trifolium	<i>T. pratense</i> (trèfle violet)	2n=2x=14	637	Allogame
		<i>T. repens</i> (trèfle blanc)	2n=4x=32	956	Allogame
	Melilotus	<i>M. officinalis</i> (mélilot officinal)	2n=2x=16	1103	Allogame
Viceae	Pisum	<i>P. sativum</i> (petit pois)	2n=2x=14	4337	Autogame
	Vicia	<i>V. faba</i> (fève)	2n=2x=12	13059	Autogame
	Lens	<i>L. culinaris</i> (lentille)	2n=2x=14	4116	Autogame
Cicereae	Cicer	<i>C. arietinum</i> (pois chiche)	2n=2x=16	931	Autogame
Loteae	Lotus	<i>L. japonicus</i> (lotier japonais)	2n=2x=16	466	Autogame
Phaseoleae	Phaseolus	<i>P. vulgaris</i> (haricot commun)	2n=2x=22	588	Autogame
		<i>V. radiata</i> (haricot mungo)	2n=2x=22	515	Autogame
	Glycine	<i>G. max</i> (soja)	2n=2x=40	1103	Autogame
	Cajanus	<i>C. cajan</i> (embrevade)	2n=2x=22	858	Autogame

Tableau In.2.: Nombre de chromosomes et taille du génome des principales Légumineuses (d'après Zhu *et al.*, 2003).

Les données sur la taille du génome proviennent de <http://rbgkew.org.uk/cval/homepage.html>. n correspond au nombre de chromosomes dans une cellule à l'état haploïde et x au nombre de base de chromosomes

est inscrite au catalogue officiel (Salernes, dont est issu le génotype F83005.5), alors qu'en Australie, le genre *Medicago* est couramment intégré dans les systèmes prairiaux (Puckridge et French, 1983).

Les Légumineuses ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de l'importante valorisation agronomique de caractéristiques uniques parmi les espèces cultivées. Initialement, une meilleure caractérisation a été entreprise en vue d'étudier les **mécanismes de fixation symbiotique** de l'azote atmosphérique. Le recours à une autre espèce modèle qu'*Arabidopsis thaliana* pour étudier le déterminisme génétique de cette particularité propre aux Légumineuses s'est imposé.

La nature des **réserves séminales** est aussi une spécificité qui fait l'objet d'une importante valorisation dans l'alimentation humaine et animale. De nombreux travaux visent à mieux caractériser les variétés cultivées sur des critères de teneurs protéiques (Krochko et Bewley, 2000). Par ailleurs, *M.tr.* et les Légumineuses plus généralement, se caractérisent par de fortes proportions en oligosaccharides (RFOs, Raffinose Family Oligosaccharides). Ces RFOs seraient une source de carbone rapidement disponible lors de la germination et ils sont impliqués dans des mécanismes de tolérance à la dessiccation (Buitink *et al.*, 2003 ; Gallardo *et al.*, 2007b ; Garcia *et al.*, 2007).

Enfin, outre ces particularités propres aux Légumineuses, la **distance phylogénétique** existant entre cette famille et l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* de la famille des Crucifères, rend indispensable le choix d'une autre espèce modèle pour représenter les Légumineuses. Une comparaison des génomes d'*Arabidopsis thaliana* et de *Medicago truncatula* a permis d'évaluer un faible degré de synténie⁴ entre les deux espèces (Cook, 1999 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Yan *et al.*, 2003).

3.1.2. Le choix de *Medicago truncatula* comme modèle des légumineuses

Medicago truncatula présente des caractéristiques permettant et facilitant les analyses génétique et moléculaire (autogamie, faible niveau de ploïdie, génome de petite taille, aptitude à la culture en laboratoire, à l'embryogénèse somatique et à la transgénèse) ainsi qu'une bonne aptitude à entrer en symbiose avec la bactérie *Rhizobium meliloti*, généralement utilisée pour les études portant sur cette spécificité des Légumineuses. Par ailleurs, le temps de génération de graine à graine est relativement court (10 à 12 semaines en conditions contrôlées) et la production importante, ce qui assure une disponibilité rapide du matériel.

M.tr. est une espèce diploïde et autogame, à la différence d'autres Légumineuses cultivées telles que la luzerne. Son génome est de petite taille : il est estimé à 466 Mb/1C, ce qui est environ dix fois inférieur à celui du pois (Young *et al.*, 2003 ; Tableau In.2). D'un point de vue phylogénétique, *Medicago truncatula* est plus proche des principales Légumineuses cultivées en Europe (Choi *et al.*, 2004 ; Figure In.6). Elle présente un fort degré de synténie avec d'autres Légumineuses cultivées, telles que le pois, le soja et la luzerne cultivée (Choi *et al.*, 2004 ; Kalo *et al.*, 2000 ; Yan *et al.*, 2003 ;

⁴ Groupes de liaisons conservés entre deux espèces

Encadré In.1 : Méthodes de détection de QTL

Adapté de de Vienne, 1998

L'identification d'un locus contrôlant un caractère quantitatif repose sur la recherche d'un déséquilibre de liaison entre ce locus et celui de loci marqueurs polymorphes. Les méthodes de détection de QTL les plus couramment utilisées sont développées ci dessous.

1. La méthode de détection marqueur par marqueur (Soller *et al.*, 1976) est basée sur une analyse de variance à un seul facteur. On réalise des comparaisons de moyennes des valeurs phénotypiques (les observations) entre deux groupes d'individus pour chaque marqueur considéré : ceux possédant l'allèle parental A et ceux possédant l'allèle parental B. Si les moyennes diffèrent, alors le marqueur considéré est lié au QTL. Cette méthode possède des inconvénients, notamment le risque de sous estimer l'effet d'un QTL fort quand celui-ci est distant du marqueur le plus proche et à l'inverse de surestimer l'effet d'un QTL faible s'il est rapproché. Par ailleurs, la position amont ou aval du QTL par rapport au marqueur n'est pas connue et les individus présentant une valeur phénotypique ou génotypique manquante ne sont pas toujours considérés.

2. Les méthodes de cartographie d'intervalle

La cartographie d'intervalle utilise la carte génétique de la population en ségrégation. Les distances entre marqueurs sont connues et la position du QTL par rapport aux marqueurs est alors déterminée.

• Cartographie d'intervalle simple (Simple Interval Mapping, SIM)

- par le maximum de vraisemblance : méthode probabiliste basée sur le calcul d'un LOD score (Logarithms of the likelihood odds ratio) (Lander et Botstein, 1989). A chaque position du chromosome (à intervalle régulier de 2 cM, par exemple), on calcule le logarithme décimal du rapport de vraisemblance (i.e., présence d'un QTL/absence d'un QTL).

$$\text{LOD} = \log \frac{\text{probabilité qu'un QTL soit présent à cet endroit du génome}}{\text{probabilité qu'un QTL soit absent à cet endroit du génome}}$$

Par exemple, un LOD score de 2 signifie que la présence d'un QTL à un endroit donné du génome est 100 fois plus probable que l'absence de ce QTL.

- par la régression multiple (Haley et Knott, 1992). Elle permet de détecter avec plus de précision des QTL proches et agissant dans la même direction, qui auraient été mal distingués par le calcul du maximum de vraisemblance.

• Cartographie d'intervalle composite (Composite Interval Mapping, CIM)

La CIM combine la cartographie d'intervalle par régression multiple et l'ajout de marqueurs génétiques comme cofacteurs à la méthode SIM (Jansen et Stam, 1994 ; Utz et Melchinger, 1994). Les cofacteurs déclarés peuvent être les marqueurs proches des QTL précédemment détectés par SIM. L'objectif est de s'affranchir de ces marqueurs aux QTL qui peuvent empêcher la détection d'éventuels QTL à effet faible.

Les méthodes basées sur la régression linéaire multiple calculent **une valeur seuil de détection du QTL** déterminant le degré de significativité statistique du QTL. Cette valeur est calculée à partir de la F-value obtenue par régression multiple.

L'intervalle de confiance (IC) du QTL offre une zone centrée autour de la position à laquelle le QTL a été détecté le plus significativement. Il peut être déterminé couramment par méthode de décroissance de valeurs LOD de 1 ou 2. L'autre méthode dite bootstrap fait intervenir un ré-échantillonnage avec remise des génotypes à partir du pool de génotypes utilisés lors de la détection de QTL (Visscher *et al.*, 1996).

Cannon *et al.*, 2003), ce qui peut aider le transfert des informations de cartographie vers des espèces d'intérêt agronomique, dont la taille du génome est bien plus importante.

3.1.3. Intérêt de *Medicago truncatula* pour caractériser les étapes conduisant à la levée

Dans la perspective d'analyser le déterminisme génétique de caractères décrivant la germination et le début de croissance, l'utilisation d'une espèce modèle est un avantage. *Medicago truncatula* a été retenue car une large collection d'accessions naturelles, des cultivars et des populations en ségrégation sont disponibles.

Ce matériel végétal est un atout pour l'étude de la diversité génétique et pour l'analyse du déterminisme génétique. Par ailleurs, cette espèce a peu été sélectionnée et a peut-être ainsi gardé une plus forte diversité naturelle sur des caractères potentiellement importants lors de la germination et de la croissance hétérotrophe. La nature particulière des réserves séminales (i.e. richesses en protéines, en RFOs) est aussi une caractéristique à prendre en compte potentiellement lorsque l'on étudie les comportements de germination et de croissance hétérotrophe. La taille de la semence de *M.tr.* facilite aussi le phénotypage à notre échelle d'étude.

Enfin, l'utilisation d'une plante modèle favorise le dialogue entre les différentes disciplines intégrées dans le cadre de nos travaux.

3.2. Ressources biologiques et outils disponibles chez *Medicago truncatula* pour l'étude du déterminisme génétique

3.2.1. Diversité génétique chez *Medicago truncatula*

Medicago truncatula est originaire du « Croissant Fertile » recouvrant la Turquie, l'Irak, l'Iran, le sud du Caucase et les pays méditerranéens limitrophes. Bien que *M.tr.* soit autogame, il existe une forte variabilité génétique, due notamment à sa dynamique de dispersion (Ronfort *et al.*, 2006). C'est une espèce opportuniste présente dans des biotopes variés (Prosperi *et al.*, 1993). Cette variabilité facilite la création de matériel destiné à des analyses génétiques.

Plus de 5700 accessions ont été recensées et conservées dans les principales collections et centre de ressources biologiques : AMGRC-SARDI⁵, INRA⁶, ARS-USDA⁷, LILM-CBBC⁸ et Samuel Roberts Noble Foundation (<http://www.noble.org/MedicagoHandbook>, 2006). Afin de préserver l'intégrité génétique de ces accessions naturelles et variétés cultivées, un ensemble de core collections a été

⁵Australian Medicago Genetic Resource Center- South Australian Research and Development Institute (Australie)

⁶Institut National de Recherche Agronomique (France)

⁷Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (Etats-Unis)

⁸Centre de Biotechnologies, technopole de Borj Laboratoire Interactions légumineuses Microorganismes (Tunisie)

Encadré In.2 : Facteurs influençant la détection de QTL et paramètres quantifiant leurs effets

Adapté de de Vienne, 1998

Facteurs influençant la détection des QTL

La puissance de détection d'un QTL dépend de plusieurs facteurs.

- Le choix des risques statistiques : la valeur du risque de 1^{ère} espèce α fixe la probabilité de détecter un QTL alors qu'il n'y en a pas (faux positif) alors que le risque de 2^{ème} espèce β donne la probabilité de ne pas détecter un QTL alors qu'il existe. La puissance du test $1 - \beta$ correspond donc à la probabilité de détecter un QTL quand il existe. Il faut donc arriver à un compromis pour limiter le risque de détecter un faux positif (α faible) sans diminuer la puissance $1 - \beta$. S'il s'agit d'une première analyse d'identification de QTL, la valeur de α peut être élevée (0.05 ou 0.1) alors qu'elle doit être très faible dans l'optique d'un clonage de QTL. Il est aussi possible de réaliser des tests de permutations par ré-échantillonnage aléatoire des données pour évaluer un seuil α empirique et robuste (Churchill et Doerge, 1994).
- Les effets du milieu (i.e., plus on contrôle les variations dues à l'environnement expérimental, plus on augmente la puissance du test de détection des QTL)
- La présence d'autres QTL en ségrégation dans le génome. Un ensemble d'individus appartenant à la même classe phénotypique pour un QTL donné n'est pas forcément identique pour les autres QTL détectés. Ainsi, les valeurs phénotypiques de ces autres individus peuvent être très différentes du premier ensemble d'individus, aux autres QTL.
- La distance entre le marqueur et le QTL. Lorsqu'un effet de QTL est faiblement détecté, deux hypothèses sont envisageables : le QTL a un effet fort mais est éloigné du marqueur, ou alors le QTL a un effet très faible mais est très proche du marqueur.
- L'effectif de la population et la densité en marqueurs. Plus l'effectif de lignées est faible, plus la détection et la localisation du QTL est difficile. Les effectifs de populations en ségrégation couramment utilisées chez les végétaux sont de l'ordre de 100 à 200 lignées. Avec cette taille de population, une carte génétique possédant une densité moyenne en marqueurs (tous les 20 cM) est suffisante. Pour augmenter la puissance de détection et la précision de localisation de QTL, on privilégie l'augmentation de taille de la population plutôt que l'ajout de marqueurs sur la carte génétique.

Paramètres quantifiant les effets des QTL

L'effet d'un QTL sur la variation d'un caractère est évalué par plusieurs paramètres qui traduisent d'une part l'ampleur de son influence sur le phénotype observé ou **part de variation phénotypique** (R^2) et d'autre part d'éventuels effets génétiques de **dominance** ou d'**additivité**.

La part de variation phénotypique donne la contribution du QTL sur la valeur phénotypique.

Dans le cadre d'analyses par régression, le R^2 quantifie cette contribution (si R^2 vaut 0.3, alors 30 % de la variation phénotypique observée est due à ce QTL).

Les effets de dominance et d'additivité sont les effets génétiques dus aux allèles d'un même locus. Dans le cas d'une analyse utilisant des LR, il n'y a pas d'effet de dominance car toutes les lignées sont homozygotes à 100% des loci. L'effet d'additivité est dû aux différences d'effets des allèles au locus considéré.

L'épistasie traduit l'effet d'interactions entre allèles de locus différents. (Deux allèles de locus différents vont cumuler leur effet et participer à la variation phénotypique).

constitué à partir de 346 lignées fixées issues des collections australiennes (AMGRC-SARDI) et françaises (INRA Montpellier). Ces lignées ont été retenues en raison de la diversité de leur origine géographique et d'une caractérisation avec des marqueurs microsatellites (Ronfort *et al.*, 2006). Les résultats ont permis de constituer un ensemble de cinq core collections constituées de 8, 16, 32, 64 et 96 génotypes respectivement. Chaque core collection intègre les génotypes de la core collection précédente, ce qui augmente la représentation de la diversité naturelle tout en conservant un nombre restreint de génotypes.

3.2.2. Matériel végétal et outils de génétique et de génomique développés

Une coordination internationale des initiatives de génomique s'est organisée autour *Medicago truncatula* à l'instar d'*Arabidopsis thaliana*. Le contexte scientifique favorable au développement de la génomique végétale a accéléré la création des outils de génétique et de génomique pour l'analyse des bases génétiques structurales et fonctionnelles (cartes génétiques, carte physique du génome, EST⁹, outils de génomique fonctionnelle et ressources bio-informatiques).

- *Analyse du déterminisme génétique par cartographie de QTL*

Les caractères d'intérêt agronomique sont majoritairement quantitatifs (i.e. masse des semences, rendement en grains...). Leurs variations observées au sein d'une population en ségrégation, c'est-à-dire une descendance présentant un fort éclatement des valeurs du caractère, sont continues et sont le résultat de l'expression de nombreux gènes et d'effets environnementaux. Ils se distinguent donc des caractères mendéliens qui varient de façon discrète ou discontinue (i.e. absence ou présence d'un organe...) et dont l'expression est contrôlée par un ou deux gènes. La variation d'un caractère quantitatif résulte du contrôle de plusieurs loci, ou QTL (Quantitative Trait Loci).

Une des principales approches possibles pour analyser les bases génétiques d'un caractère quantitatif repose sur la détection de QTL par cartographie.

Le développement des techniques de marquage moléculaire a permis la construction de cartes génétiques denses ou cartes de liaisons et ainsi la recherche de QTL en couvrant l'ensemble du génome. Afin d'identifier des locus marqueurs dont le génotype est corrélé au caractère plusieurs conditions sont à réunir (de Vienne, 1998) :

- disposer d'une descendance en ségrégation et d'une carte génétique associée ; plusieurs types de populations en ségrégation sont utilisées chez les végétaux comme les populations d'haploïdes doublés, de gamétophytes, les populations issues d'un croisement en retour ou les populations de lignées recombinantes (LR) ;
- phénotyper chaque individu de cette population ;
- mettre en œuvre de méthodes d'analyses basées sur tests biométriques permettant d'analyser conjointement les données de phénotypage et de génotypage.

⁹ EST Expressed Sequenced Tag

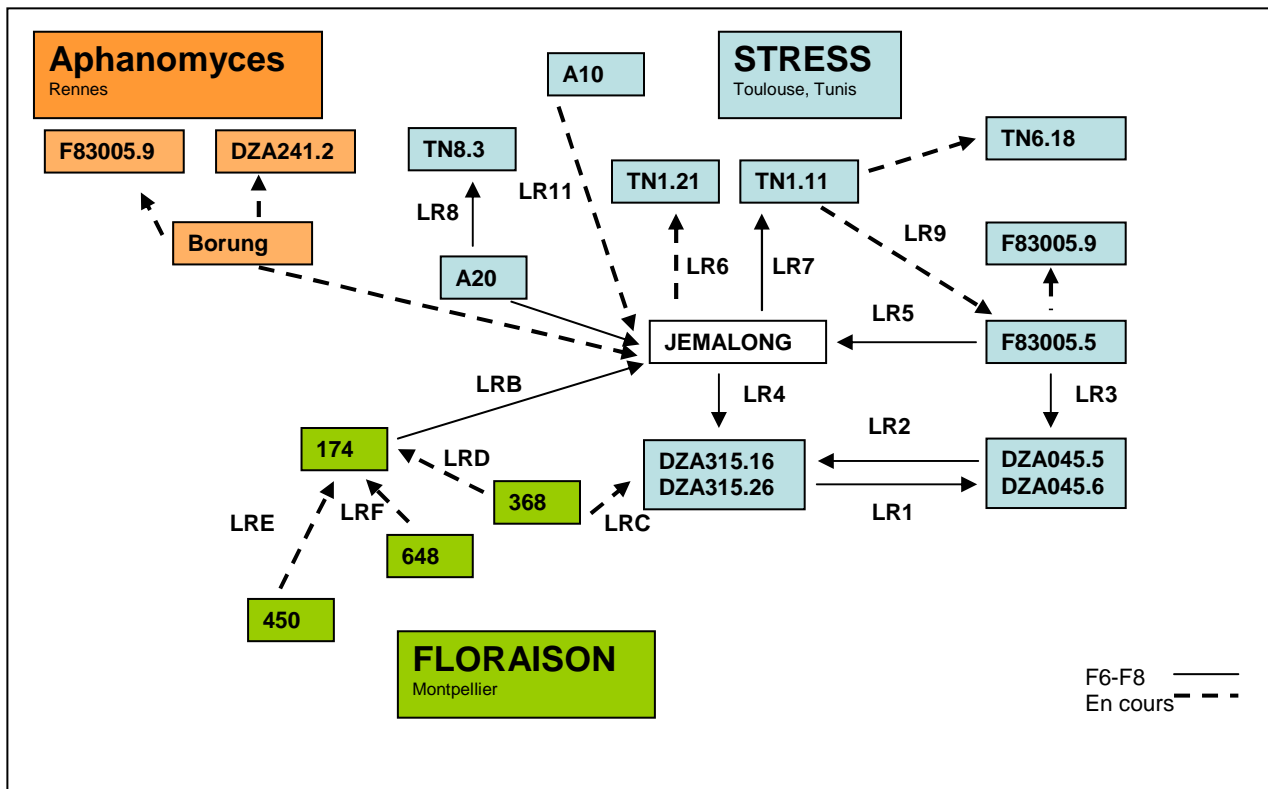


Figure In.7 : Principales populations de lignées recombinantes connectées disponibles réalisées et en cours de création pour l'étude des résistances à *Aphanomyces euteiches*, à différents stress et à l'étude de la floraison (schéma d'après thèse J.B.Pierre, 2008, B. Julier et T. Huguet, communications personnelles).

Plusieurs méthodes **de détection de QTL** existent et sont résumées dans l'encadré In.1. Les facteurs influençant la détection des QTL et les paramètres quantifiant leurs effets sont présentés dans l'encadré In.2.

Chez *Medicago truncatula*, plusieurs populations de LR sont disponibles. Les LR sont homozygotes et proviennent d'autofécondations successives d'individus F2 (5 à 6 générations ou plus). A chaque génération, une graine de chaque individu dérivé de la F2 est retenue et est à l'origine de la génération suivante (descendance monograine ou Single Seed Descent « SSD »). Les premières constructions de populations de LR ont été réalisées pour étudier la résistance aux stress abiotiques (e.g. température, salinité, stress hydrique), la résistance à *Aphanomyces euteiches* et la floraison (Figure In.7).

Outre la cartographie de QTL utilisant des descendance issues de croisements bi-parentaux, il est possible de rechercher les bases génétiques de caractères quantitatifs d'intérêt par des méthodes de génétique d'association en exploitant le déséquilibre de liaison au sein d'une large collection d'accessions représentative de la diversité génétique naturelle.

- *Carte physique et base de données bio informatiques*

Un projet international de séquençage du génome de *Medicago truncatula* (accession Jemalong A17) est en cours (www.medicago.org/genome/). Plusieurs instituts collaborent (John Innes Center, INRA-CNRS, NSF¹⁰), avec pour priorité le séquençage des régions d'euchromatine riche en gènes, soit 200 Mbp (40% du génome total de *M.tr.*). L'investissement international consenti sur cette espèce modèle implique le partage des ressources et données, rendues accessibles grâce au développement d'outils bio-informatiques. Ces outils ont pour vocation de faciliter l'accès aux informations des projets de séquençage, de permettre la recherche et la comparaison des séquences génomiques intra et inter-espèces (e.g. The Institute for Genomic Research TIGR¹¹, DFCI Medicago Gene Index¹², LIS¹³, Lotus japonicus genome) ou d'accéder à des banques de données transcriptomiques (e.g. Gene-Atlas, Truncatulix). La plupart de ces informations et liens sont recensés sur le site du projet international de séquençage de *M.tr.* (www.medicago.org). Ce projet a aussi initié la création de l'IMGAG (International Medicago Genome Annotation Group) destiné à fournir un système d'annotation automatique et coordonné des séquences.

- *Outils de génomique fonctionnelle*

Parmi les outils de génomique fonctionnelle disponibles chez *Medicago truncatula*, des puces à ADN ont été développées pour réaliser des analyses transcriptomiques. Par ailleurs, pour valider l'implication d'un gène candidat dans le contrôle d'un caractère et connaître sa fonction, une approche de génétique inverse peut être développée, qui requiert l'analyse de mutants pour le gène considéré. Chez *M.tr.*, plusieurs collections de mutants ont été développées dans le perspective de

¹⁰ National Science Foundation <http://www.nsf.gov>

¹¹ <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/mta1/>

¹² <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>

¹³ LIS Legume Information System

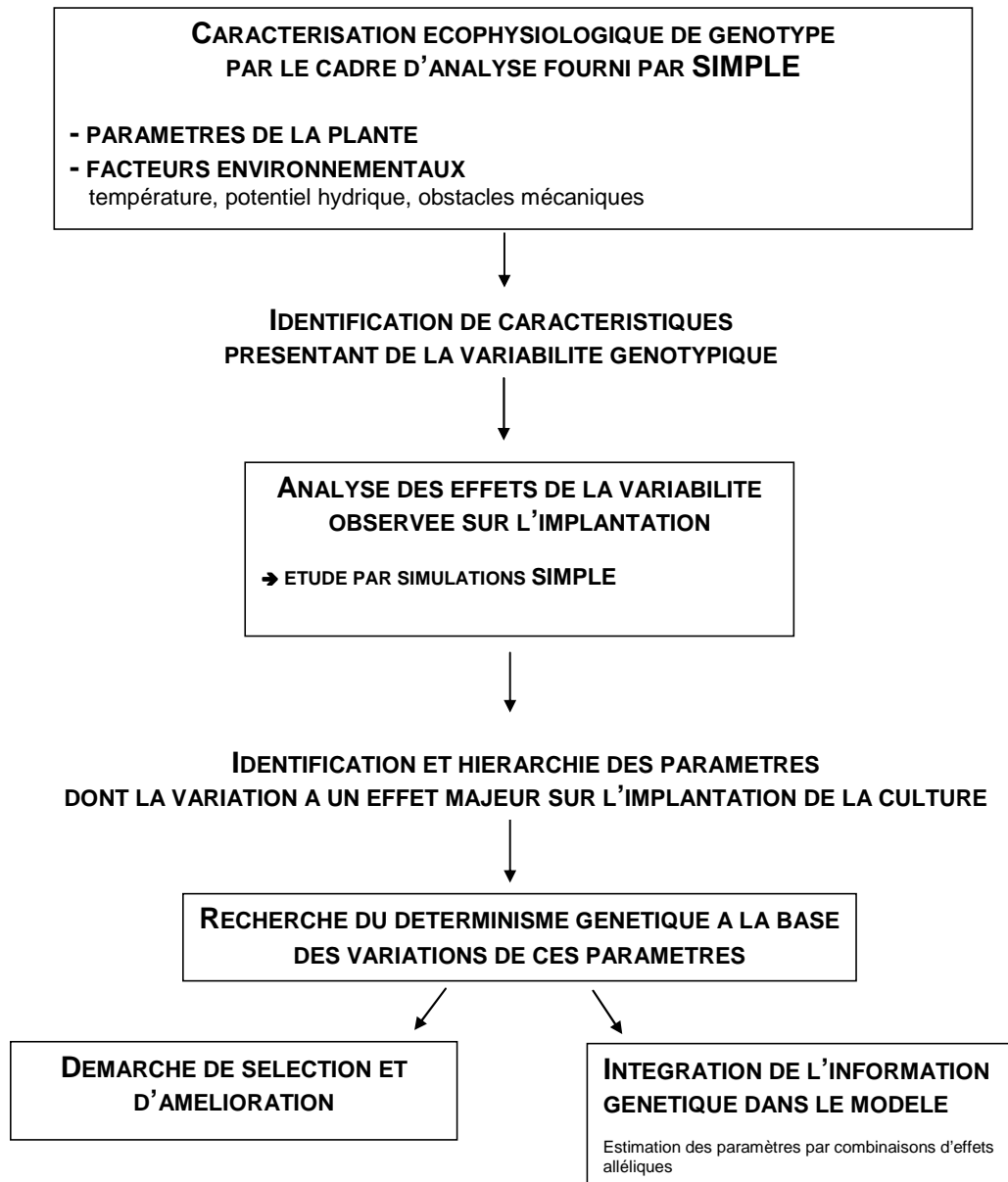


Figure In.8. : Démarche et objectifs des travaux de thèse, et perspectives envisagées.

disposer d'au moins un mutant par gène, la plupart à partir de l'accession de référence Jemalong A17. Elles sont issues de différentes techniques : mutagenèse par irradiation gamma, mutagenèse chimique à l'EMS (Ethyl Methane Sulfonate) générant des mutants « TILLING » (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), ou mutagenèse insertionnelle (par insertion d'ADN-T ou le transposon Tnt-1 du tabac).

4. Etapes de la démarche

Les travaux de la thèse permettent de caractériser *Medicago truncatula*, une espèce modèle au cours des étapes de germination et de levée en utilisant un cadre d'analyse écophysiologique. Les objectifs et la démarche des travaux présentés ont été les suivants (Figure In.8) :

- caractériser *Medicago truncatula*, en déterminant les valeurs des paramètres du modèle de prévision des levées, SIMPLE, sur plusieurs génotypes. Cette première étape permet de resituer le comportement de *M.tr.* lors de ces phases du cycle végétal, à l'aide de valeurs de paramètres utilisés en agronomie car *a priori* pertinents pour prévoir le comportement au moment de la levée. Elle aboutit à l'identification des étapes, des paramètres et des facteurs environnementaux pour lesquels des différences entre génotypes se manifestent. Certains génotypes ont été caractérisés pour trois lots de semences obtenus dans des conditions de production différentes (serre à l'INRA de Montpellier, chambre de culture de la SNES à Angers) afin de distinguer l'effet génotype d'un éventuel effet des conditions de production de semences. Cette première partie du travail est exposée dans le Chapitre I.

- utiliser le modèle pour évaluer l'ampleur d'effets génotypiques chez *Medicago truncatula*. Nous avons d'abord évalué la capacité du modèle ainsi paramétré à prévoir des levées en conditions naturelles de semis. Une fois le modèle de prévision des levées qualifié comme outil de simulation pour l'évaluation des effets génotypiques, il a été utilisé pour simuler la germination et la levée des différents génotypes caractérisés dans une large gamme de conditions (climat et caractéristiques de lit de semence). Ces simulations ont permis d'évaluer l'ampleur des modifications de levée et d'identifier les paramètres des génotypes et les conditions de milieux en cause. Enfin, nous avons simulé le comportement de génotypes présentant des caractéristiques non explorées parmi les génotypes caractérisés. L'ensemble de ces résultats fait l'objet du Chapitre II.

- ce travail de caractérisation écophysiologique des différents génotypes, fondé sur la mesure de paramètres et la simulation de leurs effets sur la levée dans une gamme de conditions de semis, nous a permis de disposer des informations nécessaires pour amorcer l'analyse du déterminisme génétique des paramètres biologiques prépondérants dans la variabilité des performances de germination et levée. Une première approche de l'étude du déterminisme génétique est présentée au Chapitre III.

Dans le travail présenté, l'utilisation du modèle de prévision des levées joue plusieurs rôles :

- définir une liste de paramètres pertinents à mesurer à l'échelle de la semence et de la plantule;
- favoriser la comparaison de différentes espèces, génotypes et lots de semences grâce à une mise en forme commune des données obtenues;
- contribuer à évaluer l'ampleur des différences de levées susceptibles d'être provoquées par la variabilité génétique mise évidence. Le modèle est alors utilisé pour simuler les effets des caractères mesurés dans différents contextes de semis.

En discussion et conclusion, on abordera un rôle supplémentaire que peut jouer à terme le modèle, en intégrant la combinaison d'effets alléliques pour l'estimation de la valeur des paramètres.

CHAPITRE I

UN CADRE D'ANALYSE ECOPHYSIOLOGIQUE
POUR CARACTERISER *MEDICAGO TRUNCATULA*
AU COURS DE LA GERMINATION ET DE LA CROISSANCE HETEROTROPHE

1. Objectifs et démarche

La caractérisation de *Medicago truncatula* a porté sur plusieurs génotypes issus d'un sous ensemble la core collection disponible pour cette espèce. Elle vise à établir les valeurs des paramètres du modèle SIMPLE pour ces différents génotypes.

Nous exposerons dans un premier temps des résultats relatifs aux comportements lors de la germination et de la croissance hétérotrophe en fonction de la température et du potentiel hydrique, deux facteurs environnementaux majeurs. Cette première caractérisation de huit génotypes permet d'établir les paramètres relatifs à ces deux étapes conduisant à la levée chez *M.tr.* et l'existence de variabilité génétique sur ces paramètres.

Nous présenterons ensuite un ensemble de mesures complémentaires réalisé afin d'obtenir les valeurs de paramètres caractérisant le comportement de quatre génotypes face aux obstacles mécaniques. Ces expérimentations ont été effectuées sur un nombre de génotypes plus restreint compte tenu des dispositifs de mesures plus difficiles à mettre en place.

2. Using A Model-Based Framework For Analysing Genetic Diversity During Germination And Heterotrophic Growth Of *Medicago Truncatula*

(Original Article¹)

Summary

Background and aims: The framework provided by an emergence model was used (1) for phenotyping germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula* in relation to two major environmental factors, temperature and water potential; (2) to evaluate the extent of genetic differences on parameters of this emergence model.

Methods: Eight cultivars or natural accessions of *M. tr.* were studied. Germination was recorded from 5 to 30 °C and 0 to -0.75 MPa, and seedling growth from 10 to 20 °C.

Key results: Thermal time to reach 50% germination was very short (15 °Cd), almost stable between genotypes, while base temperature (2-3 °C) and base water potential for germination (-0.7 to -1.3 MPa) varied between genotypes. Only 35 °Cd after germination were required to reach 30 mm hypocotyl length with significant differences among genotypes. Base temperature for elongation varied 5.5-7.5 °C. Low temperatures induced a general shortening of the seedling, with genotypes more responsive than others. No relationship with initial seed mass or seed reserve distribution was observed, which might have explained differences between genotypes and the effects of low temperatures.

Conclusions: The study provides a set of reference values to *M. tr.* users. It also provides evidence in favour of the use of ecophysiological models as valuable tools to characterize such non-crop species. It allowed the identification of phenotypic variability in response to environmental conditions related to emergence process. The model will allow simulation of emergence of genotypes in a range of environments using these parameter values. Genomic tools available for this model species will allow the genetic and molecular determinism of these differences to be analyzed.

Key words: core collection, emergence, *Medicago truncatula*, modelling, seed, temperature, water potential.

¹ Brunel S, Teulat-Merah B, Wagner MH, Huguët T, Prosperi JM, Dürr C. “Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*”. Soumis à *Annals of Botany*.

INTRODUCTION

Germination and heterotrophic growth are crucial steps for stand establishment of crops. Emergence results are highly variable for most crops and depend considerably on environmental conditions (Awadhwai & Thierstein, 1985; Durrant *et al.*, 1988, Benjamin 1990; Klos & Brummer 2000; Valenciano *et al.*, 2004). A precise description of the plant functioning during the early stages before emergence, in relation with environmental conditions, is necessary to dissect which seed characteristics, stages and growing conditions lead to emergence differences. It is also important to assess the possible genetic component of variation in emergence results (Eagles & Hardacre, 1979; Bettey *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2002; Rebetzke *et al.*, 2007). In the last decade, model plants have been the subject of rapid advances in genomics. Exploiting genetic diversity requires increasing knowledge on the phenotypic variability and there is a huge need for phenotyping collections to take advantage of the genetic and genomic tools that have been developed on model plants (genetic and physical maps, large collections of genetic resources and mutants).

Ecophysiological models which gather knowledge at the plant level provide a framework for the analysis of plant behaviour. They are designed to separate stages and to identify the influence of environmental conditions on biological processes at the plant part level (Gutschick & Simmoneau, 2002; Tardieu *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2006, 2007). In addition, they can help in the choice of relevant phenotypic traits to measure on wide range of lines. This is a key step in the analysis of inter- and intra-specific genetic diversity and could help to advance the analysis of genetic determinism (Reymond *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2003; Tardieu, 2003; Laperche *et al.*, 2006; Laperche *et al.*, 2007; Hammer *et al.*, 2006; Tardieu *et al.*, 2005). Such models have begun to be used to analyse the genetic diversity of several aspects of plant, leaf or root growth. However, the very early stages, from germination to the end of heterotrophic growth, have rarely been examined in this way (Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). It is necessary to combine such knowledge provided on one hand by the analysis of the sources of variations in crop stands, gathered in an emergence model in which the seed and seedling functioning in relation with environmental conditions are described with sufficient details, and on the other hand, by the tools available for one model species used for genomic studies.

Emergence models (Bouaziz & Bruckler, 1989 b,c; Mullins *et al.*, 1996; Finch-Savage *et al.*, 1998; Dürr *et al.*, 2001) developed for crops and more recently weeds, separate the two phases leading to plant emergence: germination, defined as radicle protrusion (Bewley and Black, 1994), and seedling growth until emergence. These models take into account the influence of the main environmental factors in a seedbed, including, soil temperature and water content. Their input parameters concerning seeds and seedlings can account for difference among genotypes.

Genotype (1)	Line Number (2)	Genetic type (3)	Place of origin, altitude (m), latitude-longitude	Available information on sensitivity to abiotic stress	Seed lot (4)
Jemalong A17	L000738	Cultivar	Spanish-Moroccan area unknown		M-05 M-06 A-06
F83005.5	L000530	Natural accession CC	France- Salernes 261m, 43.5 N- 6.23 E	Frost tolerant Salt stress sensitive	M-05 M-06 A-06
DZA315.16	L000734	Natural accession CC	Algeria - Ain El Hadjar 34.7 N - 0.16 E, 1070 m		M-05 M-06 A-06
DZA045.5	L000735	Natural accession CC	Algeria - Annaba 36.9 N - 7.7 E, 100m	Frost sensitive	M-05 M-06 A-06
DZA012.J	L000368	Natural accession CC	Algeria - Larba 36.5 N - 3.2 E, 200m		M-05 M-06
SA28064	L000174	Natural accession CC	Cyprus- Ora 34.8N - 33.2E, 554 m		M-05
Borung	L000527	Cultivar	Tunisia -Le Kef and Le Krib		M-05
Paraggio	Population	Cultivar	Italia - Calabria 39 N- 16 E, 350m		Aust-04 A-06

Table 1. Description of the studied genotypes

(1) F, DZA: France, Algeria; countries where the genotypes were collected; 83: county number; 005, 315, 045 and 012: collection sites; 5, 16, 5, J: references of the single plant taken within a population which was selfed twice to get an inbred line; SA28064: SARDI (Australian Collection); Borung and Paraggio: registration names in the Australian register of herbage plant cultivars

(2) Line number as referred at the Centre de Ressources Biologiques (INRA Montpellier, France <http://www.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>)

(3) Genotypes labelled CC belong to the first subset of the nested core collections developed at the INRA station in Montpellier.

(4) M: Montpellier; A: Angers; Aust: Australia; 04, 05 and 06: years of production 2004, 2005 and 2006.

We chose to study *Medicago truncatula* (*M. tr.*), one of the model Legumes (Cook, 1999; Tivoli *et al.*, 2006). Initially used for investigating the regulation of nodule development (Cook 1999; Thoquet *et al.*, 2002), recent work has also provided information about grain filling and seed characteristics of *M. tr.* (Gallardo *et al.*, 2003; Djemel *et al.*, 2005). However, little is known about its early stages, germination and heterotrophic growth, in relation with environmental conditions (Buitink *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2007b; Garcia *et al.*, 2007) and even less about the possible genetic diversity during these stages. Our objectives were to measure the ecophysiological parameters concerning germination and emergence for this species and to test the existence of a genetic influence on parameter values. A first set of genotypes was chosen according to three main criteria (1) different natural biotopes in order to observe potentially different responses to environmental conditions (2) a maximum genetic diversity, (3) the existence of segregating populations generated from crosses of these genotypes, and of associated genetic maps in order to further analyse the genetic determinism once differences between genotypes had been observed. Nested core-collections such as the one for *M. tr.* can provide a first relevant panel for possible phenotypic variation. Due to high synteny of *M. tr.* with other major crop legumes such as pea (*Pisum sativum* L.) and soybean (*Glycin max* L.) (Choi *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2003), the genomic regions of interest for *M. tr.* are expected to match those of other related species.

To summarise, the objectives of this study were to provide an ecophysiological analysis of the early stages of *Medicago truncatula* to help *M. tr.* users before setting up genetic and genomic analyses, i.e. to identify parameters and ranges of environmental conditions related to emergence process for which genetic diversity exist and should be further studied.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and seed production conditions

A total of eight genotypes were studied (Table 1). Jemalong A17 is the reference for genomic studies and the node of several crosses for the production of recombinant inbred line (RIL) populations. Borung and Paraggio are cultivars mainly grown in South Australia. The five other genotypes are derived from natural populations collected around the Mediterranean basin: F83005.5, DZA315.16, DZA045.5, DZA012.J, and SA28064. They belong to the first set of the nested core-collections (8 accessions, INRA *Medicago truncatula* Biological Resource Center Montpellier web site: <http://www.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>; Ronfort *et al.*, 2006). As the seed production conditions can greatly influence germination and early seedling stages, these genotypes were characterized for three different seed productions (M-05, M06 and A-06), in order to test whether genotype differences were observed regardless of seed lot.

M-05 and M-06 seeds were produced in INRA greenhouses during spring in 2005 and 2006 near Montpellier (43.61 °N, 3.87 °E, south of France, Mediterranean climate). A-06 seeds were produced in a growth chamber at the National Seed Testing Station (SNES, Angers). Paraggio (Aust-04), a commercial seedlot produced in field conditions in Australia in 2004 (Seedco Australia Co-Operative Ltd) was also studied as an external reference.

Seeds were stored at low temperature and 50% relative humidity during 8-18 months before the experiments to avoid post-harvest dormancy commonly observed during a 3-6 month period after harvest in *M. tr.* (Garcia *et al.*, 2007).

Seed physical and biochemical description

The seed dry mass (SDM) was measured on a sub-sample of 100 seeds for each genotype of each seed lot. The proportion of testa (percentage of mass of teguments relative to SDM, %T) was measured on 25 seeds after 24 hours of imbibition to facilitate the separation of teguments. Total carbon and nitrogen contents (%C and %N) were measured on two replicates (five seeds ground into powder), using a mass spectrometer (VG SIRA 9) linked to an automatic combustion analyser (Carlo Erba NA 1500). Sucrose and oligosaccharides of the raffinose family (RFOs) contents were measured as they could be indicators of the seed maturation state at harvest. Indeed, in Legumes, the RFO seed contents differ from other species (Kuo *et al.*, 1988) and during seed maturation and desiccation, stachyose content progressively decreases while verbascose content increases (Rosnoblet *et al.*, 2007). Soluble sugars were extracted from pre-weighed powder (3 replicates of 15-20 previously dried seeds) with 1 ml methanol/water (80:20 v/v) and 40 µl melizitose was used as the internal sugar standard. After heating for 15 minutes at 76 °C, the liquid was evaporated under vacuum. The pellet was then dissolved in 1 ml distilled water and centrifuged for 3 minutes at 14000 g. Sucrose (%sucrose), stachyose (%stachyose) and verbascose (%verbascope) contents were quantified using HPLC (DIONEX ICS-3000).

Input variables of the model and experimental protocols for their measurement

The SIMPLE model (SIMulation of PLant Emergence, Dürr *et al.*, 2001) predicts germination and emergence time courses and final rates, in relation to environmental conditions during sowings. This model has previously been parameterized for a number of crop species such as wheat, sugar beet, flax, mustard, bean and oilseed rape (Carrera & Dürr, 2003; Dorsainvil *et al.*, 2005; Moreau-Valancogne *et al.*, 2008) making it possible to compare different species using the same set of parameters. The functioning of the SIMPLE model and the list of equations and input variables have been described in Dürr *et al.* (2001) and Dorsainvil *et al.* (2005). We focused here on the input variables involved in germination and growth, in relation with temperature and water potential. Only the equations for calculating these input variables are presented.

Experiments were carried out to obtain base temperature ($T_{b_{\text{germ}}}$) and base water potential ($\Psi_{b_{\text{germ}}}$) values for seed germination, and base temperature values ($T_{b_{\text{elong}}}$) for seedling elongation for all seed lots and genotypes (base values are the values below which no germination or elongation occur; see calculations below). For germination as well as elongation, data collected at different temperatures were then plotted together: germination and elongation times courses were fitted to thermal time (sum of temperatures over the base temperature), as in the model, allowing seed lots and genotypes to be compared (see calculations below).

Experiments on seed germination

Before each experiment, seeds were scarified to avoid hardseededness and physical seed dormancy. Three replicates of 50 seeds were sown for each genotype from a given seedlot at each of the tested temperatures or water potentials. Seeds were individually weighed. When testing temperatures, seeds were sown in plastic boxes (5.5 x 12 x 18 cm) in pleated filter paper (ref. 3236 Whatman), moistened with 80 ml deionised water in order to obtain non-limiting water conditions for *M. tr.* germination. Boxes were kept into incubators at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 °C. Temperatures were recorded hourly with sensors (Testo 177-T3). Observations were carried out 2-5 times a day depending on the temperature being tested. The influence of light on germination rates was tested before the experiments and no differences occurred with or without illumination. When testing water potentials, boxes were incubated at 15 °C, to limit differences in germination time between genotypes due to temperature. The water potentials tested were -0.25, -0.5, -0.75 MPa. Seeds were laid onto a flat filter paper (ref. 3645 Whatman), in plastic boxes (5.5 x 12 x 18 cm), watered with 14 ml of osmotic solutions of high molecular weight PEG (Polyethylene glycol 8000 ref. SIGMA 25322-68-3) used at varying concentrations to control water potential, following Michel (1983). Seeds were considered to have germinated when the radicle protruded from the seed coat (≥ 1 mm). Remaining hard seeds despite scarification were not included in the results.

Seedling growth

Experiments were performed in the dark to mimic pre-emergence growth. Pots (6.5 cm diameter, 10 cm high) were incubated in growth chambers at 10, 15 and 20 °C. They were filled with 500 g of sand (SIFRACO quality NE34: SiO₂ > 99.7%, solid density 2.65, mean particle size 200µm). The sand water gravimetric content was raised to 0.20 kg.kg⁻¹ before sowing with a nutrient solution prepared for young seedling growth (Saglio & Pradet, 1980) and it was maintained constant to avoid water stress by watering with deionised water during the experiment. Five seeds per pot were individually weighed, scarified, and sown at 1.5 cm depth in a known position within the pots so as to be able to relate each seedling's mass to its initial seed mass. Three pots (15 seedlings) were observed at each of the six observation times until seedling length reached a plateau value (maximal elongation), which was reached at 11, 15 and 30 days at 20, 15 and 10 °C respectively.

At each observation time, seedlings were harvested and hypocotyl and radicle lengths were measured for M-05, Paraggio Aust-04 and A-06. For M-06, only the final lengths were measured. The masses of the seedling parts were measured at the same time as seedling elongation to analyse biomass distribution. The seedling parts were separated, dried at 80 °C for 48 hours and weighed for the experiments performed at 20 °C on M-05 and Paraggio Aust-04, and 10 °C on A-06. An additional experiment was carried out to evaluate the effect of initial seed mass on the maximum lengths of seedling parts. Seeds from M-05 and A-06 belonging to the same mass range (3.5-4.5 mg) were weighed and then grown in the same conditions as for the experiments at 20 °C. The final lengths of the seedling parts were measured.

Calculations

The germination rates obtained for each replicate of 50 seeds were fitted to a Gompertz function:

$$G(t) = a * \exp [(-b/c) * \exp (-ct)] \quad (1)$$

where $G(t)$ is the cumulative germination rate at time t from sowing, a the maximum cumulative germination rate, and b and c shape parameters. The adjustments were made for each temperature or water potential tested and used to calculate the time to reach y % (20 up to 80 %) cumulative germination. Values of Tb_{germ} or Ψb_{germ} are defined as the x-intercept of the linear regression between the studied factor (temperature or water potential) and germination rate (Gummerson, 1986; Dahal & Bradford, 1994). We determined the range of temperatures and water potentials for which a strong linear relationship ($r^2 > 0.95$) existed between germination rates (1/ time to reach y % germination) to calculate the x-intercepts. Base temperature and base water potential are thus defined as the fitted values for which no germination occurs.

The observed radicle and the hypocotyl lengths were fitted to a Weibull function:

$$L(t) = \alpha [1 - \exp (-(\beta t)^\gamma)] \quad (2)$$

where $L(t)$ is the length at time t , α the final length, β and γ shape parameters. Time was calculated from the time needed for 50% germination onwards in order to separate the two stages (*i.e.* germination from heterotrophic growth) and to eliminate germination rate differences between genotypes. Elongation rates (1/ time in hours to reach z mm; $z = 20$ up to 70 mm) were then calculated from these fittings for the three temperatures tested 10, 15, 20 °C. Base temperature for elongation (Tb_{elong}) was the x-intercept of the linear regression between elongation rate and temperature and thus the fitted temperature value for which no elongation occurred.

Seed lot (1)	Genotype	Seed Dry Mass SDM(mg)	Teguments	Carbon Content (%SDM)	Nitrogen Content (%SDM)	Sugars (µg/mg SDM)		
						sucrose	stachyose	verbascose
M-05 (2)	A17	4.1 abc	10.5 bcd	49.6 a	7.0 a	3.2 b	46.3 a	1.9 b
	F83005.5	3.9 abc	11.6 a	49.3 a	5.8 b	6.0 ab	43.8 a	6.5 b
	DZA315.16	3.8 cd	10.2 cd	49.2 a	6.4 ab	4.6 ab	43.7 a	4.1 b
	DZA45.5	4.5 a	11.0 abc	49.6 a	6.9 a	6.0 ab	11.3 c	31.9 a
	DZA012-J	3.6 d	10.8 abc	49.0 a	6.8 a	4.5 ab	22.8 bc	38.5 a
	SA28064	4.3 ab	9.6 d	49.2 a	6.7 a	6.5 a	40.5 ab	4.9 b
	Borong	3.6 d	11.5 ab	48.8 a	6.9 a	3.1 b	49.3 a	6.8 b
M-06 (2)	A17	4.1 b	10.4 ab	48.3 c	7.3 a	2.9 d	56.4 a	1.6 b
	F83005.5	3.9 b	12.1 a	48.3 c	6.3 c	5.3 b	44.5 b	6.4 b
	DZA315.16	3.9 b	10.3 b	49.5 ab	6.9 abc	5.5 b	49.3 ab	5.1 b
	DZA45.5	4.7 a	10.5 b	50.1 a	7.1 ab	7.1 a	13.5 d	38.7 a
	DZA012-J	3.6 b	11.4 a	48.8 bc	6.5 bc	4.0 c	21.9 c	34.9 a
A-06 (2)	A17	3.8 b	10.8 b	50.3 a	7.3 ab	4.0 c	67.3 a	3.6 d
	F83005.5	3.7 b	11.2 b	49.2 a	6.3 b	7.5 b	55.8 a	10.0 b
	DZA315.16	3.3 b	12.3 a	46.9 a	6.1 b	6.3 b	53.1 a	5.9 cd
	DZA45.5	4.7 a	11.1 b	49.6 a	7.8 a	9.7 a	9.6 b	35.2 a
	Paraggio	5.2 a	9.6 c	49.1 a	6.9 ab	9.6 a	48.6 a	7.0 bc
Aust-04	Paraggio	4.1	9.5	50.0	7.6	6.4	53.5	1.7
S effect (3)		3.8 *	7.3 ***	0.3 ns	4.7 *	26.8**	9.2***	2.05 ns
G effect (3)		26.8 ***	12.4***	0.8 ns	34.1***	57.4**	109***	200.1***
SxG effect (3)		1.6 ns	9.0 ***	1.0 ns	3.6 *	3.2*	2.3 ns	1.0 ns

Table 2. Description of the genotypes and of their seed characteristics

(1) M: Montpellier; A: Angers; Aust: Australia; 04, 05, 06: years of production 2004, 2005 and 2006; (2) Means followed by different letters are for significantly different genotypes within a given production site ($P < 0.05$ level; Tukey multiple comparison test); (3) Seed lot (S), Genotype (G), and interaction (SxG) effects obtained from analyses of the four genotypes common of the three seed lots. F values are followed by level of significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.0005$, ns for non significant.

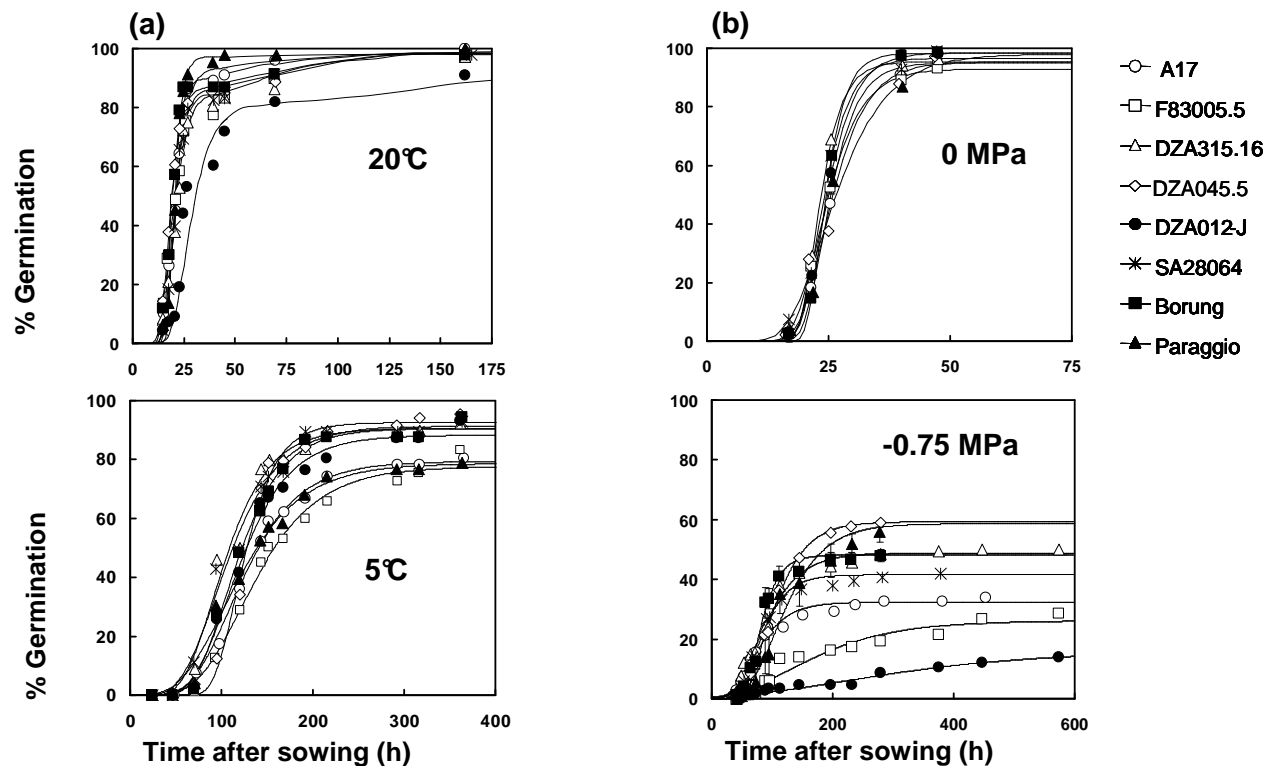


Figure 1. Germination (a) at 20°C and 5°C (b) at 0 MPa and -0.75 MPa at 15°C, for M-05 seed lot and Paraggio Aust-04. Error bars denote standard error. Lines are the fittings to Gompertz function.

Hence, time was expressed in thermal time TT , using the following equation:

$$TT_i = \sum_{d=1}^{d=i} (T_{md} - T_b) \quad (3)$$

with TT_i cumulative thermal time on day i , T_{md} mean temperature of day d , T_b the base temperature calculated for each genotype and seedlot. The calculation of time starts the day (day 1, $d=1$), at which half the seeds have germinated, in order to consider elongation time separately from germination. This calculation of time was used in equations (1) and (2) to compare germination and growth of the different genotypes and seed lots.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using STATGRAPHICS Plus 3.1. Software. For univariate analysis, all the data were analysed in two steps. First, genotype, seedlot, temperature or water potential and interaction effects were estimated from multifactorial analysis of variance on the four genotypes common to the three seed lots (A17, F83005.5, DZA315.16, DZA045.5). Secondly, genotype effects were compared within each seed lot. All the mean comparisons were made using Tukey test or Bonferroni's multiple comparison procedure when samples sizes differed ($P < 0.05$). Subsequently, a multivariate statistical analysis was performed to visualise all the genotypic effects on variables. A principal components analysis (PCA) was carried out on the four common genotypes of the three seed lots. Variables that were available for the three seed lots were divided into classes. These classes were drawn up on the basis of mean result comparisons. The germination variables for analysis were Tb_{germ} , Ψb_{germ} , thermal time to reach 70% germination ($TT_{70\%}$), final percentage of germination at 5 °C ($FP_{5^{\circ}\text{C}}$), 30 °C ($FP_{30^{\circ}\text{C}}$) and -0.5 MPa ($FP_{-0.5}$), -0.75 MPa ($FP_{-0.75}$) and final lengths (FL) of radicle and hypocotyl at 10 °C and 20 °C. Subsequently, the other genotypes and seed characteristics i.e. SDM, %T, %N, %sucrose, %stachyose) were plotted onto the multivariate space as additional individuals or additional variables respectively.

RESULTS

Characteristics of the seeds

Several seed characteristics expected to differ according to seed production conditions and genotypes, and which can influence germination and growth results, were measured. Seed dry masses (SDM, 3.3-5.2 mg) and proportion of testa (%T, 9.6-12.3%) differed between seed lots and genotypes and were negatively correlated (Table 2). The average SDM and %T of A-06 (3.9 mg, 11.4%) were significantly different from those of M-05 and M-06 (4.1 mg, 10.8%), which could be in relation with the different seed production environments. But the main differences were between genotypes.

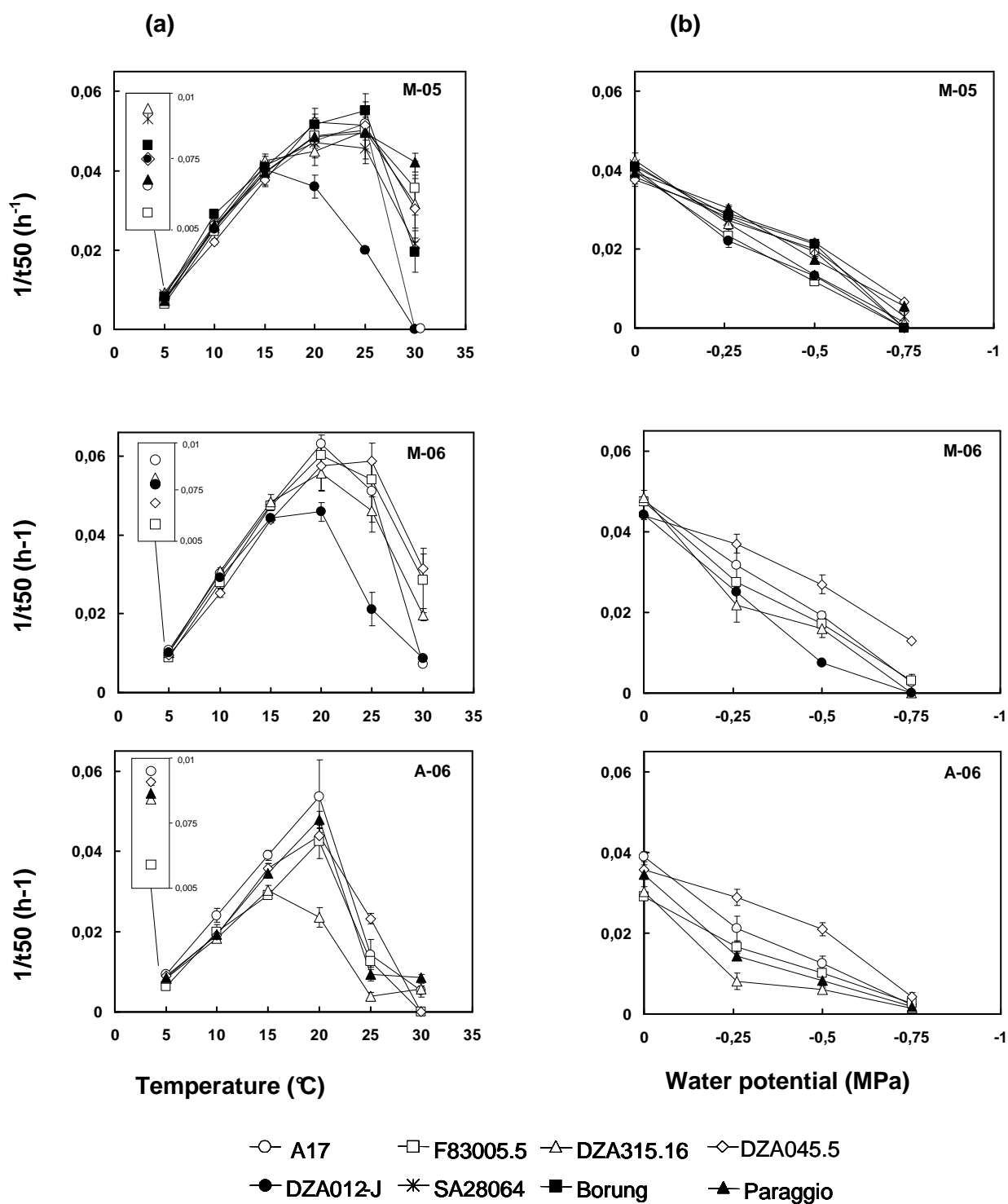


Figure 2. Germination rates ($1/t_{50}$ germination) (a) as a function of temperature and (b) as a function of water potential, for the three seed lots M-05, M-06, A-06 and Paraggio Aust-04. Error bars denote standard error.

As regards the four genotypes common to the three seed lots, DZA315.16 had the smallest average SDM (3.7 mg) while DZA045.5 had the highest (4.6 mg). When considering all the genotypes of a given seed lot, the range of values remained the same. Paraggio (A-06) resembled DZA045.5 with a high SDM (>4.5 mg), while Borung and DZA012.J had low SDM (≤ 3.8 mg) like DZA315.16. SDM variations were positively correlated with time between pollination and natural abscission (data not shown). F83005.5 had the highest average %T (11.7%). The interaction between genotype and seed lot was mainly due to DZA315.16, the T% of which had contrasted values according to seed lot. When analysing all the genotypes of a given seedlot, DZA012.J (M-06) had one of the highest values like F83005.5, while Paraggio (A-06) and SA28064 (M-05) had the lowest. Even if %T values remained within a small range, they were positively correlated to the number of remaining hard seeds after scarification (data not shown).

The seed carbon content (%C) was very similar between seed lots and genotypes and was 49% on average. In contrast, %N varied from 5.8% to 7.3%. A-06 had slightly higher %N than the two other seed lots but the major effect was due to genotype. F83005.5 had the lowest value whereas DZA045.5 and A17 had the highest. All the other genotypes presented values of about 7%. Stachyose and verbascose contents were high as expected for Legume seeds, but large variations were observed among genotypes. The seed lot effect was slight and only significant for %stachyose, with higher values for A-06. As regards the four common genotypes, %verbascose of DZA045.5 was much higher than for the others. Conversely, DZA045.5 %stachyose was lower suggesting a greater conversion to verbascose for this genotype. When considering all the genotypes of a given seed lot, DZA012.J seeds had high %stachyose and low %verbascose like DZA045.5 seeds.

Germination

Effect of temperature

Seeds were individually weighed to test any putative effect of initial seed mass on germination. No relationships between SDM and germination rate and final percentage were observed regardless of seed lot, genotype and temperature (data not shown).

Final germination percentages were high for all the tested temperatures for all seed lots and genotypes (Table 3), even at extreme temperatures. They remained most often over 80% except at 30 °C. Germination time courses are presented for two contrasted temperatures, 20 °C and 5 °C, for all the genotypes of M-05 and Paraggio Aust-04, the external reference (Fig. 1a). At 20 °C, germination was very fast. Fifty percent germination was reached in less than 22 hours after sowing for all the genotypes, except for DZA012.J which required significantly more time. At 5 °C, germination time courses were much slower than at 20 °C for all the genotypes. At this temperature, two groups of genotypes could be distinguished: F83005.5, A17 and Paraggio germinated slower than the others and hardly reached about 80% germinated seeds.

Seed lot (1)	Genotype	Temperature (°C)						Water Potential (MPa)		
		30	25	20	15	10	5	-0.25	-0.5	-0.75
M-05 (2)	A17	53 ab	97 a	100 a	95 a	95 a	81 c	93 a	98 a	36 bc
	F83005.5	81 a	90 a	96 ab	93 a	97 a	83 bc	92 a	87 ab	29 cd
	DZA315.16	85 a	96 a	97 ab	96 a	97 a	92 ab	98 a	89 ab	47 abc
	DZA45.5	86 a	94 a	99 a	97 a	96 a	96 a	94 a	99 a	60 a
	DZA012-J	34 b	86 a	91 b	98 a	96 a	93 a	88 a	67 bc	14 d
	SA28064	88 a	99 a	98 ab	99 a	99 a	93 a	95 a	58 c	47 abc
M-06 (2)	Borung	75 a	100 a	98 ab	99 a	97 a	94 a	97 a	99 a	51 ab
	A17	86 ab	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	99 ab	100 a	71 b
	F83005.5	91 ab	100 a	93 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	69 b
	DZA315.16	100 a	100 a	92 a	99 a	100 a	100 a	96 b	99 a	36 c
	DZA45.5	90 ab	99 a	100 a	100 a	100 a	100 a	99 ab	99 a	99 a
A-06 (2)	DZA012-J	79 b	99 a	100 a	99 a	100 a	100 a	99 ab	83 a	32 c
	A17	88 ab	85 a	96 a	99 a	100 a	100 a	99 a	98 a	91 a
	F83005.5	73 ab	79 a	91 a	100 a	100 a	97 a	100 a	100 a	96 a
	DZA315.16	87 ab	54 b	99 a	99 a	99 a	99 a	98 a	99 a	64 b
	DZA45.5	69 b	95 a	96 a	100 a	100 a	99 a	100 a	99 a	89 a
Aust-04	Paraggio	94 a	83 a	93 a	99 a	99 a	99 a	99 a	95 a	84 ab
	Paraggio	98	50	100	91	95	79	97	99	63
	S effect (3)	31.5***						98.7***		
	G effect (3)	2.86*						22.4***		
	T or Ψ effect (3)	44.4***						359.2***		
	SxG effect (3)	3.6**						9.81***		
	SxT or Sx Ψ effect (3)	14***						39.7***		
	GxT or Gx Ψ effect (3)	3.9***						14.9***		
	SxGxT or SxGx Ψ effect(3)	3.9***						7.00***		

Table 3. Final germination percentages at different temperatures and water potentials.

Seed lot (1)	Genotype	Base temperature Tb for germination (°C)	Base water potential Ψ b for germination (MPa)	Base temperature Tb for elongation (°C)
M-05 (2)	A17	2.5 a	-1.01 b	6.0 bc
	F83005.5	3.0 a	-0.69 c	5.7 bc
	DZA315.16	2.4 a	-0.72 c	5.9 bc
	DZA45.5	2.3 a	-1.22 a	5.4 c
	DZA012-J	2.7 a	-0.73 c	7.1 ab
	SA28064	2.4 a	-0.92 b	6.5 abc
	Borung	2.5 a	-0.99 b	7.4 a
M-06 (2)	A17	2.0 ab	-0.82 b	
	F83005.5	2.7 b	-0.88 b	
	DZA315.16	2.2 ab	-0.68 c	
	DZA45.5	2.2 ab	-1.32 a	
A-06 (2)	DZA012-J	1.9 a	-0.57 d	
	A17	1.8 b	-0.70 bc	7.1 a
	F83005.5	1.7 ab	-0.75 b	6.6 ab
	DZA315.16	0.9 a	-0.55 d	3.1 c
	DZA45.5	1.9 b	-1.21 a	7.0 ab
Aust-04	Paraggio	1.9 b	-0.60 cd	5.6 b
	Paraggio	2.5	-0.91	5.6
	S effect (3)	43.1***	9.7***	0.5 ns
	G effect (3)	9.1***	149.1***	16.3***
Aust-04	SxG effect (3)	3.7**	5.4***	18.2***

Table 4. Base temperatures and water potentials for the different genotypes.

(1) M: Montpellier; A: Angers; Aust: Australia; 04, 05, 06: years of production 2004, 2005 and 2006.(2) Means followed by different letters are for significantly different genotypes within a given production site ($P < 0.05$ level; Tukey multiple comparison test).(3) Seed lot (S), Genotype (G), Temperature (T), Water Potential (Ψ) and interaction effects (SxG, SxT or Sx Ψ , GxT or Gx Ψ , SxGxT or SxGx Ψ) obtained from analyses of the four genotypes common of the three seed lots. F values are followed by level of significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.0005$, ns for non significant.

Figure 2a presents, for all genotypes and for the three seed lots the inverse of the time to reach 50% germination ($1/t_{50}$) for the whole range of tested temperatures. The relationships between temperature and germination rate are bell shaped. The optimum germination temperatures differed among genotypes and seed lots and were rather low, ranging from 15 to 25 °C. For M-05, the germination rate of DZA012.J markedly decreased between 15 °C and 20 °C. For the other genotypes, the decrease in $1/t_{50}$ occurred between 25 and 30. At this extreme temperature, A17 and DZA012.J did not even reach 55% germination (Fig. 2a). The germination rates of M-06 and A-06 differed from M-05. M-06 germinated the fastest whatever the temperature. A-06 was the slowest and showed a sharp decrease in the germination rate over 20 °C (Fig. 2a; Table 3). When comparing the genotypes for a given seed lot, two genotypes differentiated above 15 °C: DZA012.J and also DZA315.16 in A-06. At the highest tested temperature (30 °C), A17 and DZA012.J were always greatly affected, whatever the production site and year. At the lowest tested temperature (5 °C), only $1/t_{50}$ values of F83005.5 were always significantly lower than those of the other genotypes whatever the seed lot.

Base temperatures for germination ($T_{b_{\text{germ}}}$) were calculated from the linear zone of the relationship between temperature and germination rate, *i.e.* 5-15 °C (Fig. 2a). For the four genotypes common to the three seed lots, all the main and interaction effects were significant (Table 4). The major effect was due to seed lot. For A-06, germination rates were much lower than for the two other seed lots and $T_{b_{\text{germ}}}$ values (0.9-1.9 °C) were very different. In addition, the interaction between seed lots and genotypes was mainly explained by DZA315.16 in A-06. For the two fast germinating seed lots (M-05 and M-06), $T_{b_{\text{germ}}}$ values were similar, varying from 1.9 °C to 3 °C. The genotype effect was due to the highest value of F83005.5 (3 °C for M-05 and 2.7 °C for M-06). The same range of $T_{b_{\text{germ}}}$ values was obtained when considering all the genotypes of a given seed lot, with significant differences only for M-06 (Table 4).

Germination was plotted against time calculated as thermal time with the genotype and the seedlot specific $T_{b_{\text{germ}}}$. Using this expression of time, the germination time courses at 5, 10 and 15 °C (the range of temperatures used for $T_{b_{\text{germ}}}$ calculations) overlapped for a given genotype for each seedlot, except the final percentages which were lower at low temperatures for some genotypes. Two examples of M-05 genotypes are shown in Figure 3a: A17, the reference in genomics and F83005.5, the genotype with the highest $T_{b_{\text{germ}}}$ value. When pooling all the data obtained at the different temperatures, germination time courses also overlapped for the different genotypes of a given seed lot with no differences remaining in germination rates between genotypes for M-05, M-06 and Paraggio Aust-04 (Fig. 3b,c,d). Thermal times for 70% germination ($TT_{70\%}$) were very short for all genotypes. They ranged from 13 to 16 °Cd for M-05 and M-06, and they were significantly higher for A-06, ranging from 16 to 25 °Cd. When comparing the four genotypes common to the three seed lots, no significant differences were observed.

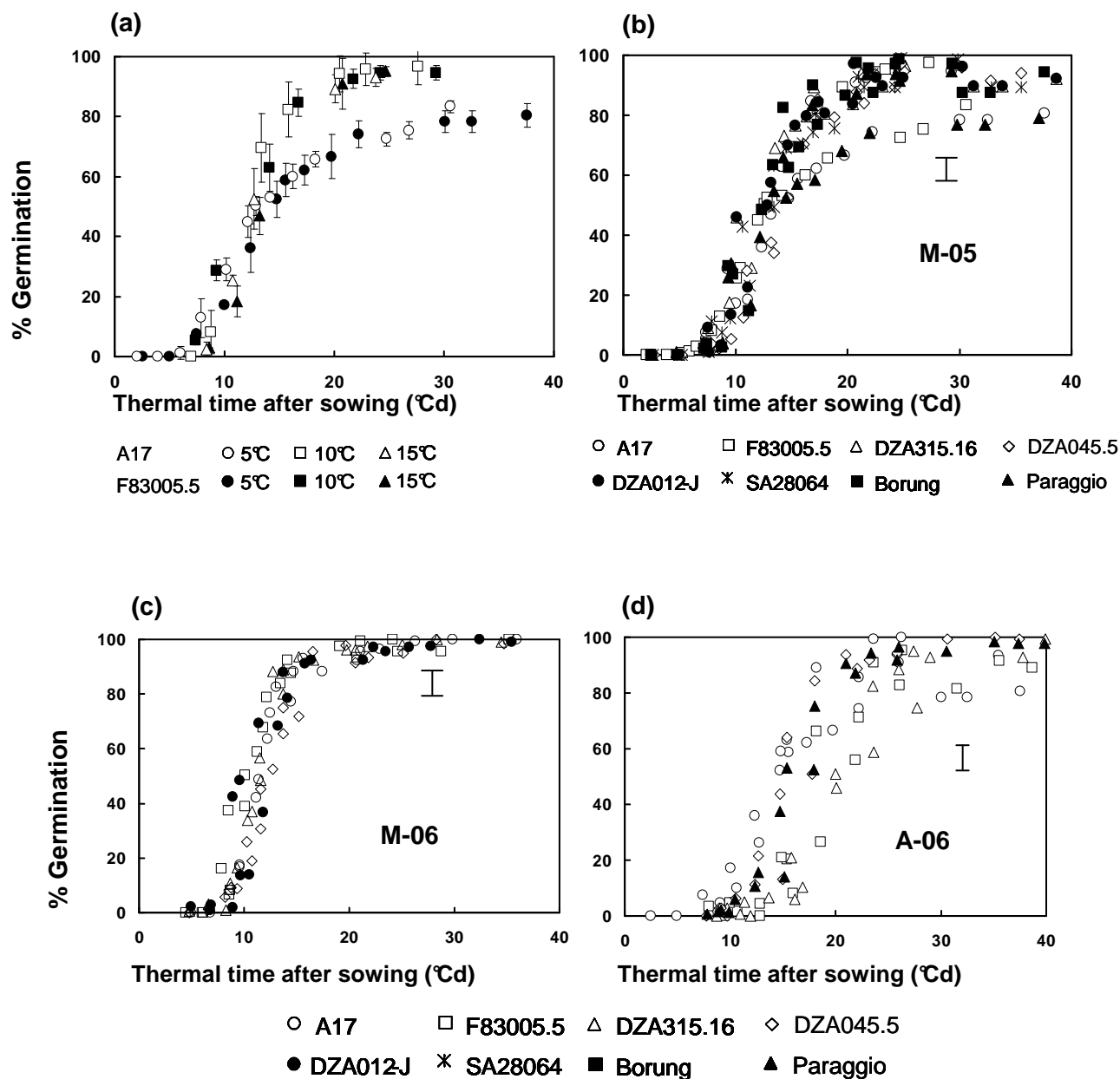


Figure 3. Germination time courses expressed in thermal time (°Cd) (a) at 5, 10, 15°C for two genotypes, A17 and F83005.5 in M-05 seedlot; and by pooling all the temperatures for each genotype of M-05 (b), M-06 (c), A-06 (d) seed lots and Paraggio Aust-04. Error bars denote standard error.

Effect of water potential

The lowest water potential tested, -0.75 MPa, strongly affected germination courses and final percentages (Fig. 1b; Table 3). Final percentages (FP) most often remained over 80% for higher water potentials. When considering FP of the four common genotypes of the three seed lots, all the main effects and interactions effects were significant (Table 3). There was a large effect of seed lot mainly observed at -0.75 MPa, with A-06 FP higher than FP of the other seed lots. The most contrasted genotypes were DZA315.16 with the lowest final germination percentage and DZA045.5 with the highest. Of the other genotypes, DZA012.J had the lowest final percentages (Table 3).

Germination rates decreased sharply with decreasing water potential for all the genotypes in all the seed lots (Fig. 2b). Regarding germination rates (1/t50) of the four common genotypes, seed lot and genotype had significant effects (data not shown¹⁵). Germination rates of A-06 were significantly lower than those of M-05 and M-06. DZA045.5 had always the highest germination rate whatever the water potential and the seedlot. Of the other genotypes, DZA012.J had significantly lower germination rates (Fig. 2b). Base water potential values ($\Psi_{b_{\text{germ}}}$) were calculated for all seed lots from the germination rates at 0, -0.25 and -0.5 MPa. For this range, the relationship between water potential and germination rate was linear (except for DZA315.16 in A-06 and M-06) and germination final percentages were not altered. For the four genotypes common to the three seed lots, the major significant effect was due to genotypes: DZA045.5 had the markedly lowest Ψ_b values, -1.25 MPa in average while DZA315.16 had the lowest, -0.65 MPa in average (Table 4). The seed lot effect was due to A-06, the mean Ψ_b value of which was higher. $\Psi_{b_{\text{germ}}}$ remained in the same range of values for the genotypes of a given seed lot, with DZA012.J having the highest one. Further analysis of DZA045.5 seed imbibition (data not shown) did not reveal any differences in imbibition rate or in seed water content reached before germination, despite its contrasting $\Psi_{b_{\text{germ}}}$ value.

Seedling growth in the dark after germination

Regarding the morphology of *M. tr.* seedlings growing in the dark after germination, no differences appeared regardless of the seed lot and genotype. Only the two cotyledons with no leaves, a hypocotyl and a main radicle with no lateral roots were observed (*i.e.* the organs already existing in the seed embryo). Hypocotyl and radicle elongation of the M-05 seed lot are shown at 20 °C and 10 °C in Figure 4. Whatever the temperature, genotype or seed lot, elongation progress curves in the dark of these two seedling parts were sigmoid and reached a plateau value. The average final lengths (FL) were calculated from the two last measurements when the plateau was reached and which did not differ statistically. The lower the temperature, the shorter the final lengths of both seedling parts were. Hypocotyl FL varied between 50-78 mm at 20 °C, and between 46-74 mm at 10 °C (Fig. 4; Table 5). Radicle FL varied between 28-65 mm and between 27-46 mm at 20 °C and 10 °C respectively.

¹⁵ La figure n'a pas été présentée dans l'article mais se trouve dans la conclusion, à la fin du chapitre.

Seed lot (1)		Hypocotyl final length (mm)			Radicle final length (mm)		
		20°C	15°C	10°C	20°C	15°C	10°C
Genotype							
M-05 (2)	A17	75.2 ab	72.0 ab	63.6 abc	44.4 cd	39.3 cd	38.7 abc
	F83005.5	67.6 abc	57.7 c	46.2 d	51.7 bc	45.2 ab	34.0 bc
	DZA315.16	76.0 a	76 a	69.5 a	57.5 ab	53.5 a	46.1 a
	DZA45.5	65.0 c	67.2 bc	62.9 abc	45.6 cd	40.7 cd	33.5 bc
	DZA012-J	66.6 bc	68.7 abc	55.1 cd	39.1 d	34.7 d	30.5 c
	SA28064	71.6 abc	76.3 a	60.8 bc	60.4 a	46.4 b	38.1 b
	Borung	70.0 abc	74.6 ab	66.8 ab	47.8 c	35.6 cd	31.5 bc
M-06 (2)	A17	70.2 b	73.5 a	68.6 a	46.0 c	43.4 b	35.0 b
	F83005.5	64.8 b	64.9 b	51.4 c	54.0 b	41.5 b	34.8 b
	DZA315.16	78.0 a	70.9 a	73.1 a	64.7 a	57.1 a	45.5 a
	DZA45.5	63.8 b	70.0 ab	60.7 b	39.2 c	36.2 b	30.8 b
	DZA012-J	67.6 b	74.8 a	60.9 b	42.2 c	37.0 b	34.6 b
A-06 (2)	A17	69.2 a	68.8 b	63.7 a	35.0 ab	45.9 a	32.7 ab
	F83005.5	50.5 b	68.2 b	48.1 b	41.4 ab	48.2 a	32.2 ab
	DZA315.16	51.7 b	59.9 b	60.8 a	41.8 a	50.8 a	35.7 a
	DZA45.5	50.7 b	63.7 b	48.6 b	27.8 b	37.3 b	27.5 b
	Paraggio	70.1 a	80.9 a	64.4 a	45.1 a	47.8 a	34.8 a
Aust-04	Paraggio	69.9	72.2	73.8	57.4	41.5	33.9
S effect (3)		48.2***			34.4***		
G effect (3)		52.3***			106.1***		
T effect (3)		32.0***			93.2***		
SxG effect (3)		8.7***			6.8***		
SxT effect (3)		8.2***			20.7***		
GxT effect (3)		6.1***			3.7**		
SxGxT effect (3)		3.3***			0.8 ns		

Table 5. Hypocotyl and radicle final lengths at 20, 15 and 10°C.

(1) M: Montpellier; A: Angers; Aust: Australia; 04, 05, 06: years of production 2004, 2005 and 2006;(2) Means followed by different letters are for significantly different genotypes within a given production site ($P < 0.05$ level; Tukey multiple comparison test);(3) Seed lot (S), Genotype (G), Temperature (T) and interaction effects (SxG, SxT, GxT, SxGxT) obtained from analyses of the four genotypes common of the three seed lots. F values are followed by level of significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.0005$, ns for non significant.

For the four common genotypes, hypocotyl and radicle FL were significantly different between genotypes and seed lots (Table 5). The lengths were shorter for A-06 compared to both M-05 and M-06. A-06 was mainly responsible for the significant interaction effect between seedlot and temperature, especially for radicle FL. Regarding the genotype effect, two genotypes could be distinguished whatever the seedling parts: DZA315.16 had the longest radicles and hypocotyls and DZA045.5 the shortest whatever the temperature and the seed lot. In addition, for the three seed lots, F83005.5 seedling parts were the most reduced in length at 10 °C (Fig. 4; Table 5). Of the other genotypes of a given seedlot, Paraggio developed long seedlings at all temperatures. An additional experiment was carried out to test whether the differences in FL between genotypes were partly related to the variations in initial seed masses. The radicle and hypocotyl FL were measured for all the genotypes of all seed lots for a given range of seed mass (3.5-4.5 mg). It showed that genotype rankings remained the same as when the whole range of initial seed masses was used (data not shown). Figure 5 shows the relationship between the hypocotyl elongation rates (the inverse of the time needed to reach 30 mm hypocotyl length; $1/t_{30\text{ mm}}$) and temperature for M-05 and A-06 (not measured for M-06). For M-05, a linear relationship was obtained for the range of tested temperatures (10, 15 and 20 °C). This range was used to calculate base temperature for elongation ($T_{b\text{elong}}$). For A-06, the linear relationship between $1/t_{30\text{ mm}}$ and temperature was broken above 15 °C whatever the genotype. We only used 10 and 15 °C were used for $T_{b\text{elong}}$ calculations for this seed lot, assuming linearity between these two temperatures. Calculated $T_{b\text{elong}}$ values were always higher than $T_{b\text{germ}}$ values (Table 4). There was no seed lot effect on the four common genotypes but significant genotype and interaction effects. $T_{b\text{elong}}$ ranged from 5.4 °C (DZA045.5) to 7.1 °C (A17) except for DZA315.16 in A-06 (which explained most of the strong interaction effect detected). For the other genotypes in M-05, $T_{b\text{elong}}$ varied within a similar range.

As for germination, these results were used to calculate elongation times in thermal time with specific genotype $T_{b\text{elong}}$. Examples are shown for A17 and F83005.5 in M-05 and A-06 (Fig. 6a). Using this expression, elongation progress curves, for the different temperatures used for $T_{b\text{elong}}$ calculation, overlapped for a given genotype. Differences remained in the FL of F83005.5 because they were shorter at low temperatures. When the data for the different temperatures were pooled for each genotype, elongation curves for all the genotypes of a given seed lot also tended to be superimposed. However, differences remained in elongation rates (Fig. 6b). For instance, thermal time to reach 30 mm hypocotyl length ($TT_{30\text{ mm}}$) after germination for M-05, varied from 22 to 34 °Cd with Borung, SA28064, DZA012.J, A17 having the lowest values and F83005.5, DZA315.16 the highest. The $TT_{30\text{ mm}}$ values of A-06 were generally much higher, ranging from 19 to 48 °Cd, A17 having the lowest value and DZA315.16, the highest.

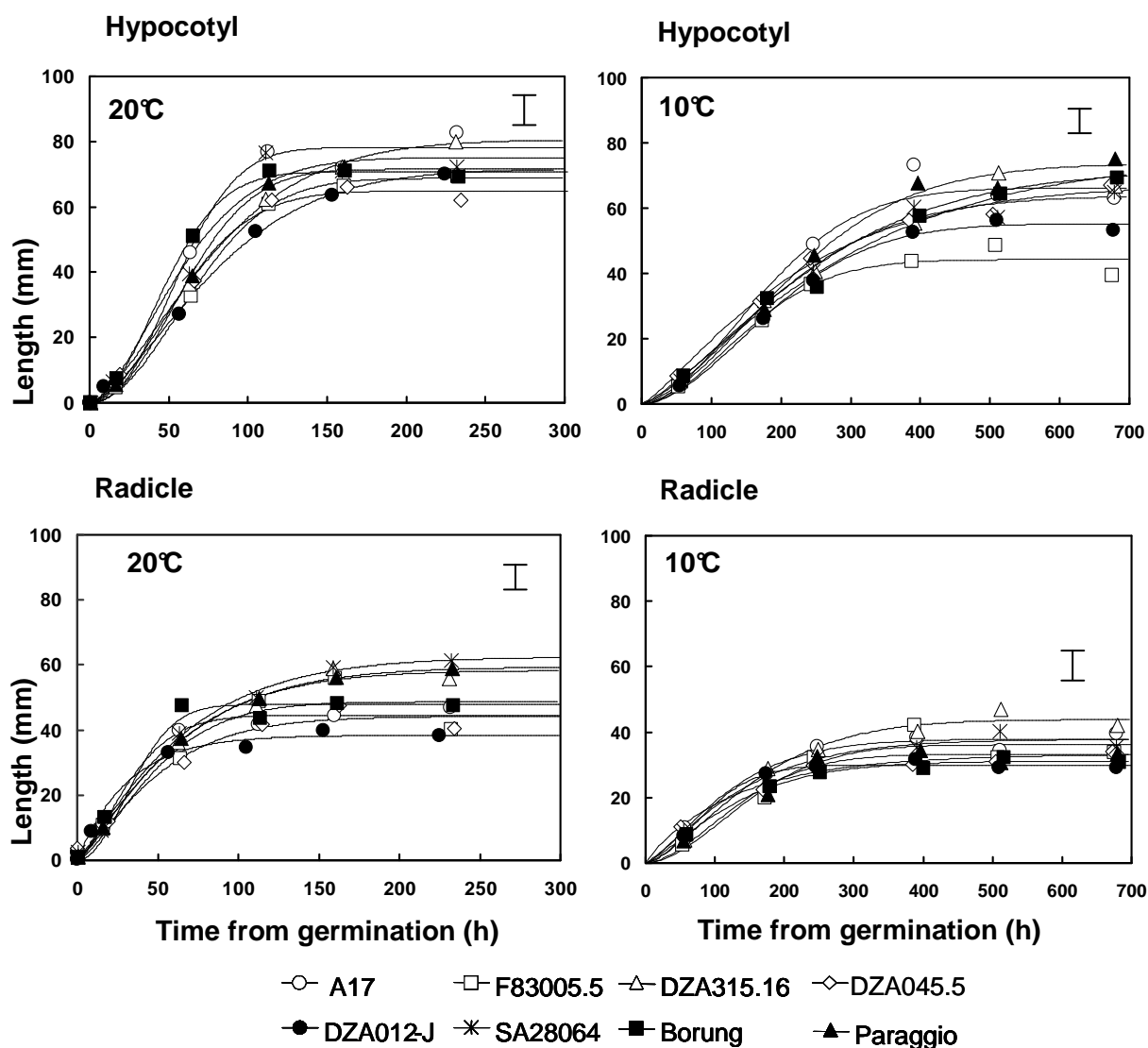


Figure 4. Hypocotyl and radicle elongation at 20 and 10°C for the M-05 genotypes and Paraggio Aust-04. Error bars denote standard error. Lines are the fittings of Weibull function.

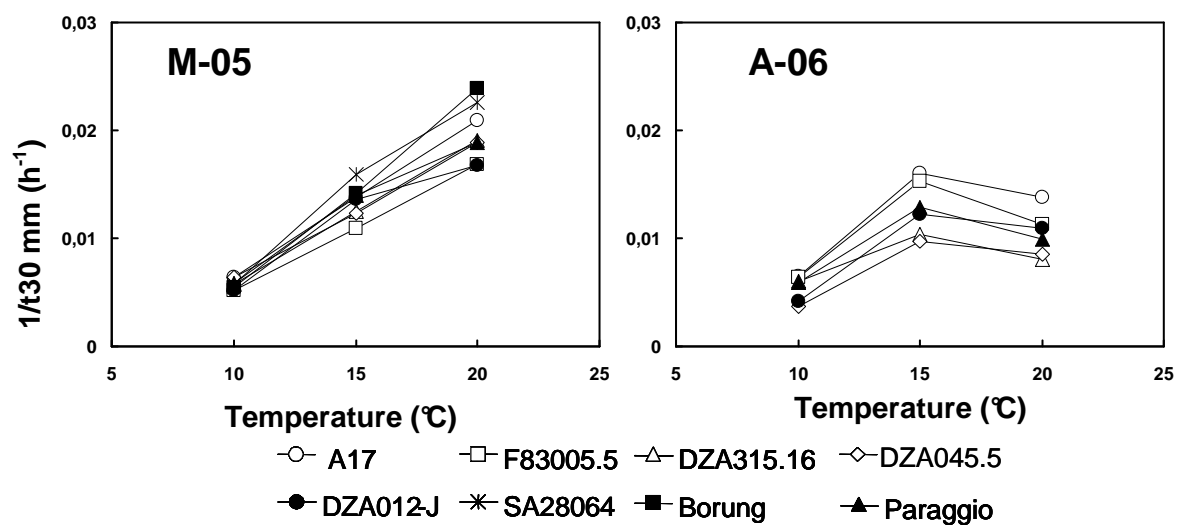


Figure 5. Hypocotyl elongation rate (1/time after germination for 30 mm length) according to temperature for M-05, A-06 seed lots and Paraggio Aust-04.

Biomass changes during growth in the dark

The redistribution of the mass of seed reserves was analysed according to temperature and genotype in parallel with seedling elongation in darkness. The changes in seedling masses over time and in the different parts are described in Figure 7 for two genotypes with contrasting hypocotyl elongation at 20 °C and 10 °C (*i.e.* A17 and F83005.5). The masses are expressed relative to their corresponding initial SDM, as the masses of seedling parts could be influenced by initial SDM. They are referred to as DMc%, DMh%, DMr% and DMs% for the cotyledons, hypocotyl, radicle and whole seedling respectively (Fig. 7). Moreover, time is expressed in thermal time after germination with genotype-specific Tb so as to compare experiments on seedling growth performed at different temperatures and on different genotypes. Using this method of presentation, no significant differences in the biomass changes of each seedling part were observed between genotypes and temperatures. This contrasted with the differences observed on FL. The same general trends were obtained for biomass changes regardless of temperature and genotype. DMs% decreased only slightly with time to reach 85-90% of SDM at about 150 °Cd at the end of elongation. These net losses could only be due to respiration or exudations. In contrast, changes were observed for the different seedling parts. After germination, DMc% sharply decreased from more than 80% to about 30-40% of SDM reached at 50 °Cd. This decrease corresponded to the use of the cotyledon seed reserves. Afterwards, DMc% remained almost stable. During the same period, DMh% sharply increased up to 40% until it reached a plateau at about 40 °Cd. DMr% remained low, increasing only at the beginning of growth up to 10% of SDM reached at about 15 °Cd and then slowly decreasing. Thus, the reserves stored in cotyledons were mainly transferred to the hypocotyl part with no differences between temperatures despite the differences observed in FL.

Principal component analysis on germination and elongation data

A principal component analysis (PCA) was performed to visualize the main sources of variability in germination and elongation data obtained between genotypes and seed lots (Fig. 8). Four principal components (PC) provided a good summary of the data (86% of total variance). The first component (PC1) explained a large proportion of the variance (44%). It was predominantly determined by covariation of high FP_{0.75}, low FL variables, low Tb_{germ} and high TT_{70%}. Thus, PC1 discriminated A-06 from the other seed lots. Variables related to responses to extreme temperatures, *i.e.* FL_{10°C}, FP_{5°C}, Tb_{germ} and FP_{30°C}, characterized the second component (16% of total variance). This axis mainly differentiated genotypes: F83005.5 from DZA315.16 and A17. The third component (15% of total variance) was determined by FP_{30°C}, TT_{70%}, Tb_{germ} and hypocotyl FL_{20 °C}. It discriminated DZA045.5 from A17, and to a less extent M06 from M05 when considering a given genotype. In the fourth component (11% of total variance, not shown), the predominant variable was Ψb_{germ} and to a lesser extent radicle FL_{20°C}. It differentiated DZA045.5 from F83005.5 and also M-06 from M-05.

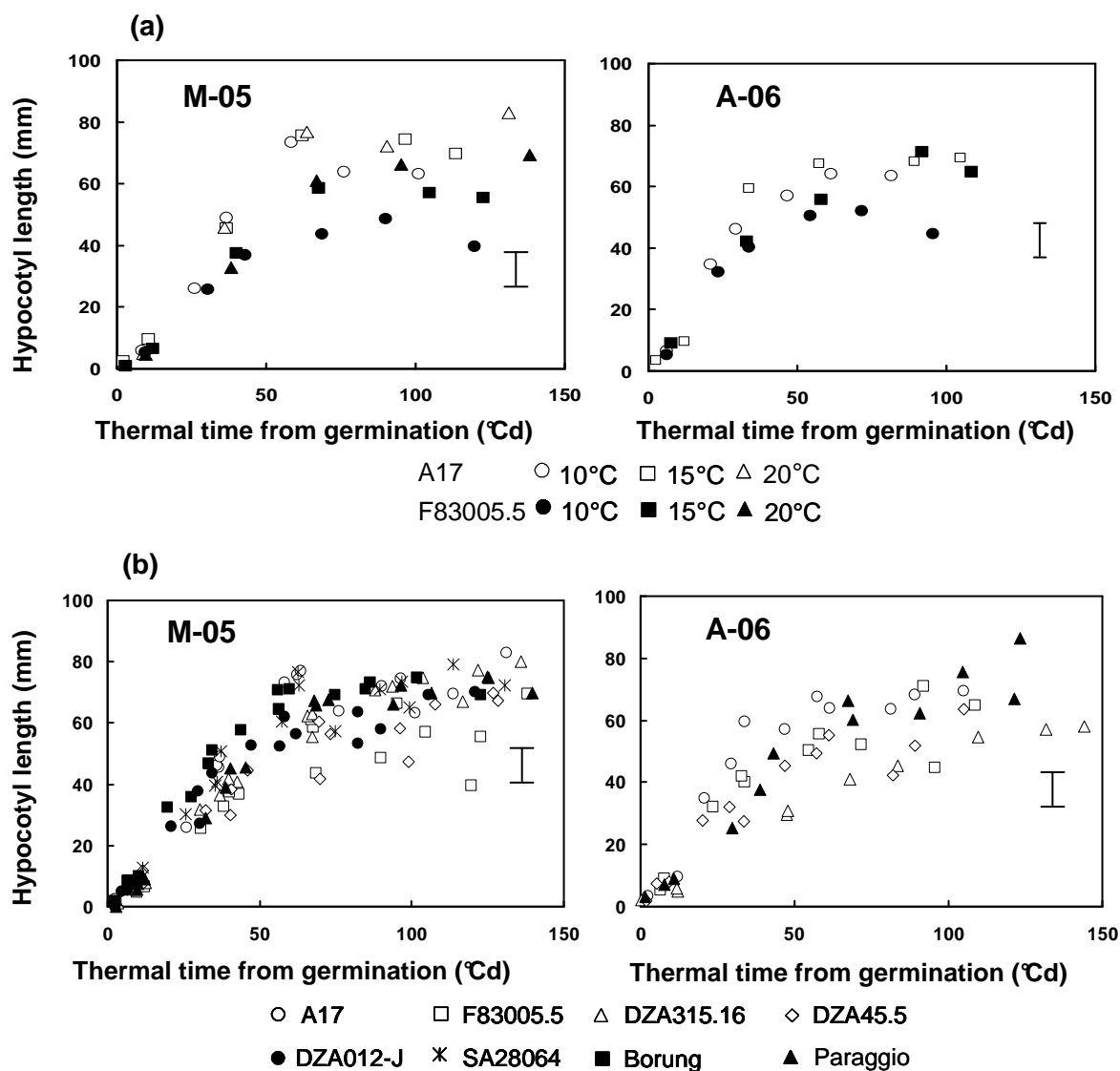


Figure 6. Elongation time courses expressed in thermal time (°Cd) after germination (a) at 10, 15, 20°C for two genotypes A17 and F83005.5 in M-05 and A-06; and (b) when gathering all the temperatures for each genotype of M-05, A-06 and Paraggio Aust-04. Error bars denote standard error.

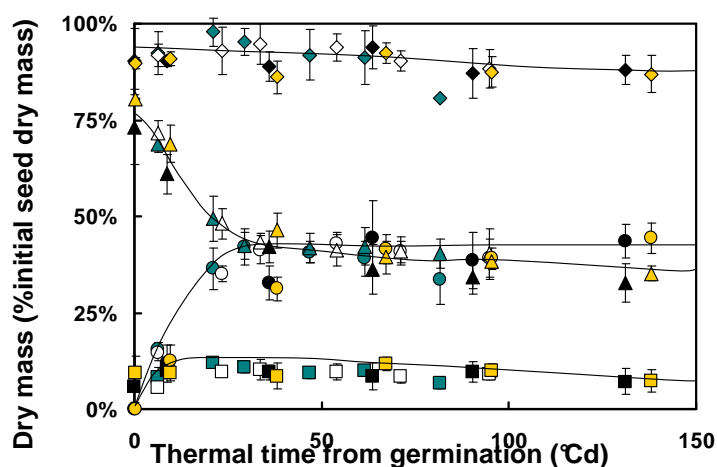


Figure 7. Changes in seedling part dry masses over time for A17 and F83005.5 at 20°C and 10°C. Symbols used are the following: radicle (□), hypocotyl (○), cotyledons (△) and seedling (◇). Symbols for A17 are white at 10°C and black at 20°C; symbols for F83005.5 are dark grey at 10°C and light grey at 20°C. Error bars denote standard error.

Finally, seed lot were mainly distinguished by PC1 (A-06 vs. both M-05 and M-06) and to a lesser extent by PC3 and PC4 (M-06 vs. M-05) whereas genotypes were differentiated mostly by PC2 and PC4. When plotting the additional genotypes within this multivariate space, they were positioned close to the genotypes of their corresponding seed lot. They did not bring additional variability.

When plotting seed characteristics within the multivariate space, the first axis corresponded to the characteristics of A-06: small seeds, high %stachyose and %sucrose, and high %T. The positions of the seed characteristics along the second axis correlated with the specific position of F83005.5 compared to the other genotypes: low %N, high %sucrose and %stachyose, high %T. Along the third and fourth axis, DZA045.5 was distinguished from the other genotypes. Seed characteristics of DZA045.5 were grouped along these two axes: high % sucrose, low %stachyose and high SDM.

DISCUSSION

A framework for germination and heterotrophic growth analysis to help functional genomics approaches

The present study used an ecophysiological model to examine germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*, a species mainly studied for genetic and molecular purposes (Young *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2003; Buitink *et al.*, 2006). This species provides a wide genetic variability and natural biodiversity. The existence of nested core collections (Ronfort *et al.*, 2006) enabled us to observe genetic diversity despite the relatively small number of genotypes we studied. This is an advantage compared with working on bred species for which genetic variability at the early stages have been reduced by man selection or have been influenced by selective breeding for other aspects of plant growth. An example is the decrease in coleoptile length observed in some cultivars when breeding for limiting plant height in wheat (Botwright *et al.*, 2001; Rebetzke *et al.*, 2007; Ellis *et al.*, 2004).

Genetic and molecular determinism of germination have been studied on model species such as *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula* but rarely with the aim of gaining knowledge for improving variables related to crop establishment. Many studies focus on seed dormancy (Chibani *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2006) as it is an important physiological trait of seeds and these two model species are prone to this obstacle to germination. However, dormancy is more characteristic of wild or weed species than of cultivated ones. The environmental factors or metabolic pathways studied are often those influencing dormancy (*e.g.* nitrate or hormone levels). Early growth after germination has received even less attention (Gendreau *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 2002). Therefore, collecting agro-ecophysiological information on these early stages for a model species should help the analysis and improvement of variables involved in emergence process.

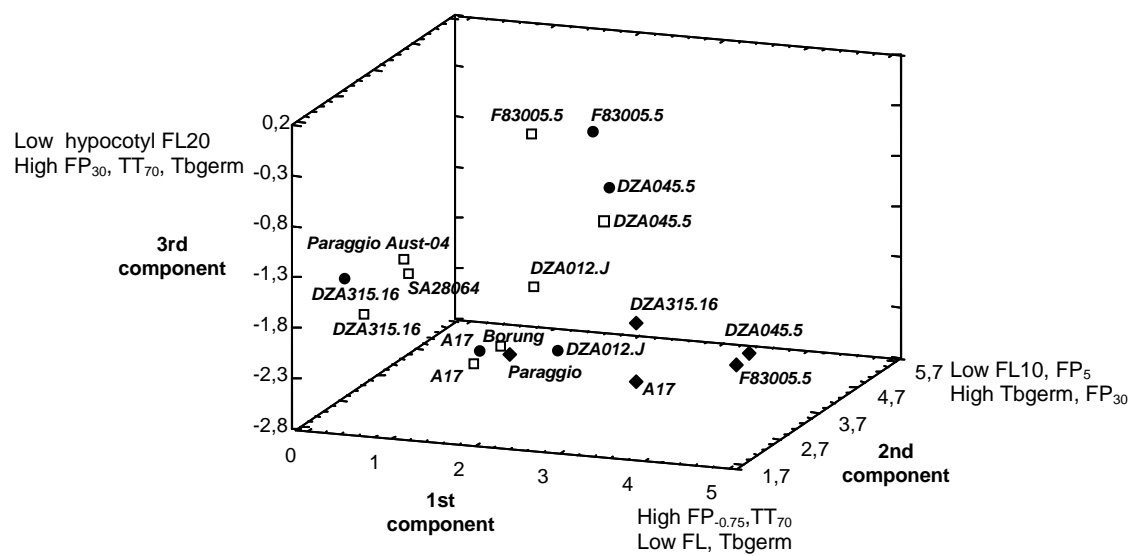


Figure 8. Principal component analysis plot of germination and elongation data for the genotypes. The three first components are represented (75% of the total variance). Symbols represent the seed lots: M-05 (□), M-06 (●) and A-06 (◆).

Such studies should contribute to a better link between ecophysiological knowledge of plant growth and studies on genetic determinism. This can contribute to fill the gap between results relative to the same stages but obtained at different scales (Hammer *et al.*, 2006; Thomas, 2008).

Our study was based on the framework provided by an emergence model with the aim of analysing variation in relevant parameters which lead to emergence. The model separates the two stages before emergence, *i.e.* germination and pre-emergence growth, and describes the influence of the main environmental factors during emergence in agronomic conditions. This proved essential in the present study, as the genotypes which differentiated were not the same depending on phase and environmental factor.

Main characteristics of *Medicago truncatula* germination and heterotrophic growth

A strong effect of seed production conditions and dormancy on early stages results

Seeds of the *Medicago* genus, like other Legume seeds, are prone to hardseededness (Martin & De la Cuadra, 2004; Taylor, 2005; Zeng *et al.*, 2005) and seeds must be scarified to avoid this supplementary source of variation in the results when studying germination response to environmental factors. Moreover, post-harvest embryonic dormancy lasts several months for *M. tr.* and can disturb germination studies. The constant lower germination and elongation rates for the genotypes produced in a growth chamber (A-06) could be due to residual dormancy for some genotypes of this seed lot, even though we had left the time recommended in order to avoid this problem. The A-06 specificities could also be related to lower light intensity during plant growth. More generally, as production conditions can influence germination and seedling growth, it was important to study several sets of seed production conditions for each genotype.

Fast germination and elongation rates but in a narrow range of environmental conditions

Despite the previous considerations, it has been possible to draw general conclusions and this study demonstrates that agro-ecophysiological models are valuable tools to analyse the functioning of such non-crop species. As regards germination, the range of temperatures over which *M. tr.* germinates is wide, from 5 to 35 °C. But, the range in which the relationship between temperature and germination rate is linear is narrow: 5-15 °C. Optimum temperature was rather low with germination rates often decreasing above 20 °C, depending on genotype and seed lot. Many physiological or genomic studies are carried out at this temperature: our results pointed out that this usual temperature may not be suitable when studying germination mechanisms other than response to temperature, a temperature about 15°C being more appropriate. A role assigned to the emergence model was to provide mathematical formalism for comparing genotypes, seed lots, as well as species.

In particular, the calculation of thermal time often used for crop development modelling allowed genotype comparisons and also comparisons with other species.

Once time was expressed in thermal time, it appeared that the time taken to achieve germination process did not vary between genotypes. It was the threshold values under and over which germination did not occur any more, which differed. Tb_{germ} varied from 2 to 3 °C, a range frequently observed for several other species: oilseed rape (Marshall & Squire 1996), white mustard (Dorsainvil *et al.*, 2005), sugar beet and carrot (Gummerson, 1986; Tamet *et al.*, 1996). A similar value was found for *Arabidopsis* leaf development (Granier *et al.*, 2002). These values are quite low and indicate that *M. tr.* can germinate in cold conditions. This is consistent with its belonging to the Galegoïd cool season growing group of Legumes, as opposed to Phaseolids which have tropical origins and higher temperature requirements (soybean and cowpea Tb_{germ} 4 °C and 8.5 °C respectively, Covell *et al.*, 1986; French bean Tb_{germ} 8 °C, Moreau-Valancogne *et al.*, 2007). In addition, *M. tr.* takes about 15 °Cd to reach 80% germination, and thus belongs to a group of very fast germinating species: bean (Moreau-Valancogne *et al.*, 2007), white mustard (Dorsainvil *et al.*, 2005) and oilseed rape (Marshall & Squire, 1996). Concerning water potential effects, *M. tr.* appeared to be very sensitive to decreasing potentials. Germination was greatly altered below -0.5 MPa. Few species have such high Ψb_{germ} values (Dorsainvil *et al.*, 2005). The narrow range of environmental conditions due to temperature and water potential requirements within which germination is possible and rapid, is evocative of plant behaviour in the case of wild or weed species, waiting for favourable germination conditions within the soil. The differences in environmental requirements between species should be kept in mind when studying the effects of both temperature and water potential on germination, as the underlying mechanisms may not be the same (Nishiyama, 1972; Sung *et al.*, 2003). Determinism studies of responses to contrasting environmental factors may only be transposable to similar species.

Concerning seedling growth, thermal time to reach 30 mm hypocotyl length was about 30 °Cd after germination and final length was obtained at 60 °Cd. Elongation, as well as germination, was very fast compared to other studied species (Dürr & Boiffin, 1995; Dorsainvil *et al.*, 2005), but similar to other studied Legumes (French bean and pea; Moreau-Valancogne *et al.*, 2007; Raveneau *et al.*, 2008). Low temperatures considerably shortened the seedling parts with some genotypes more responsive than others. We found no relationship between seedling shortening and the reserve allocation to the different plant parts. This shortening induced by low temperature with no change in seed reserve allocation was already observed for crop species (Tamet *et al.*, 1996; Dürr and Boiffin, 1995). Bouaziz & Hicks (1990) observed the same results with water stress. Many aspects of plant metabolism can be involved in the effects of low temperatures (Sung *et al.*, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2007; Penfield, 2008) and should be investigated to analyse differences between genotype. Cell elongation is sensitive to hormonal changes (Ellis *et al.*, 2004; Schopfer, 2006; Rebetzke *et al.*, 2007). Changes in cell wall and membrane properties can be involved. Extensins are proteins involved in cell elongation changes at low temperatures (Weiser *et al.*, 1990). Moreover, changes in lipid metabolism can influence membrane fluidity (Vaultier *et al.*, 2006). Increases in cell content of soluble sugars have also been shown to be involved in tolerance to cold stress (Bourion *et al.*, 2003).

The additional measurements on seeds of the different genotypes and seed lots did not reveal any correlation between seed mass and germination rate, final percentages or final lengths. Sucrose and RFOs seed contents were also measured as they may be involved in mechanisms related to desiccation (Bailly *et al.*, 2001; Rosnoblet *et al.*, 2007) and cold tolerance (Gilmour *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Moreover, stachyose, and to a lesser extent verbascose contents increase during late maturation together with a sharp decrease in sucrose content (Rosnoblet *et al.*, 2007), and could be indicators of seed maturation. We observed contrasting soluble sugar contents for the A-06 seedlot compared to the two others, correlated with general phenotypic differences during early stages. In addition, DZA045.5 had contrasting verbascose and stachyose contents and it germinated the fastest at low water potentials. These results suggest that sucrose and RFOs, accumulated during seed maturation, could be important in germination and heterotrophic growth but this point requires further study.

Existence of genetic diversity on model parameters

Our results should help *M. tr.* users to choose the recombinant inbred line (RIL) populations with contrasting parental lines for the genetic analysis of the response to environmental factors. It should also help to focus on the parameters responsible for this diversity. An important result is that the genotypic differences were not the same according to the environmental conditions and stages considered. During germination, genotypes differed at extreme temperatures and water potentials: F83005.5 was the less tolerant to low temperatures, DZA012.J and A17 were more responsive to high ones, and DZA045.5 better tolerated low water potentials. When time was expressed as thermal time, the remaining germination differences between genotypes were low. The main differences were thus in the Tb_{germ} and Ψb_{germ} values and in the final germination percentages. During elongation, F83005.5 was once again the most responsive to low temperatures. Once time was expressed in thermal time as for germination, differences between genotypes remained for elongation rates and also for their final length at low temperatures.

Paraggio, the cultivar chosen for comparison with the genotypes of the core collection, had no extreme behaviour during the studied stages. It was however among the genotypes which germinated the fastest, in the widest ranges of temperature and water potential as Borung and A17, the other studied cultivars. These three cultivars had also among the longest hypocotyls. These characteristics are not criteria for crop selection, but the ability to emerge is necessary for a cultivar to be finally selected. The genotypes found to be more responsive to variations in temperature or water potential might have developed adaptive strategies related to their geographic origins. The low germination and elongation rates of F83005.5 at low temperature may be related to its collection in a hill area, where autumn, the germination season for this annual species, is cool. Its ability to wait for milder conditions could be an adaptive advantage compared with other genotypes which risk freezing. In contrast, DZA045.5 has faster germination at low water potentials which could be an adaptation to water stress as this genotype grows in salty soils.

Finally, the RIL5 (A17 x F83005.5) and the RIL1 populations (DZA315.26 x DZA045.5) have been respectively chosen to further study the effects of low temperature and water potential on germination and growth before emergence.

A part of the genetic diversity found on parameters was observed for environmental conditions not taken into account in the model as they do not influence emergence. For instance, concerning germination, the largest differences between genotypes were observed at 20 °C and above. These temperatures were not taken into account in the thermal time calculations as they fell outside the linear relationship with temperature, and thus outside of the limits of model function. In the field, high temperatures are rare at crop sowing and thus model predictions are not limited by that point. Therefore, differences between genotypes for these conditions would not lead to differences in emergence results in many sowing conditions. The emergence model will be used to simulate emergence of the different genotypes in different conditions. This should enable to evaluate the extent of emergence variations in different environments due to genetic variation of the emergence model parameters. The model will also be used to test virtual ideotypes in order to assist breeding programmes.

3. Effets de obstacles mécaniques

Les différences entre génotypes peuvent exister sur d'autres paramètres du modèle que ceux qui viennent d'être étudiés. La caractérisation des génotypes a été dans un premier temps focalisée sur les effets de la température et du potentiel hydrique, compte tenu de leurs effets majeurs sur les cinétiques et les taux finaux de germination et de levée.

Les obstacles mécaniques ont aussi une forte influence en particulier sur la levée. La caractérisation de leurs effets nécessite des mesures lourdes à réaliser. Elles requièrent des protocoles et du matériel spécifique qui ne peuvent pas être utilisés sur de grandes séries. Ces caractérisations complémentaires du comportement des plantules face aux obstacles mécaniques reposent des mesures de forces d'émergence et des mesures des taux de plantules bloquées sous différentes tailles de mottes.

L'objectif de ces mesures est aussi d'établir le paramétrage complet du modèle afin de pouvoir réaliser une étude par expérimentation numérique. En outre, cette étude doit permettre d'évaluer l'ampleur des effets des différences des génotypes sur les résultats de germination et la levée dans différentes conditions de semis.

Ces mesures des effets des obstacles mécaniques ont été réalisées sur quatre génotypes.

Les génotypes **Jemalong A17** et **Paraggio**, deux cultivars, ont été choisis en raison de leurs rôles de référence tout au long de la thèse et pour la communauté scientifique travaillant sur *Medicago truncatula*. Dans tous les résultats établis au laboratoire, ces génotypes présentent des cinétiques rapides de germination et d'allongement dans la gamme de conditions étudiées.

Les génotypes **F83005.5** et **DZA315.16** ont été retenus en raison de leur sensibilité aux conditions environnementales extrêmes testées. Le génotype F83005.5 est sensible aux basses températures. Ses cinétiques de germination et d'allongement sont ralenties, et son taux final de germination ainsi que ses longueurs finales de radicule et d'hypocotyle sont réduites. Le génotype DZA315.16 est sensible à des températures supérieures à 15°C au cours de la germination.

Nous avons travaillé sur le lot A-06 car la quantité de semences disponibles était plus importante pour ce lot et permettait l'ensemble des expérimentations.

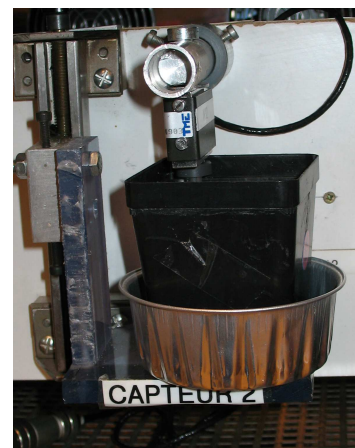


Figure 1.9 : Dispositif de mesure des forces d'émergence : enceinte renfermant les capteurs et détails de la mise en place d'une plantule (axe de l'hypocotyle) sous la jauge.

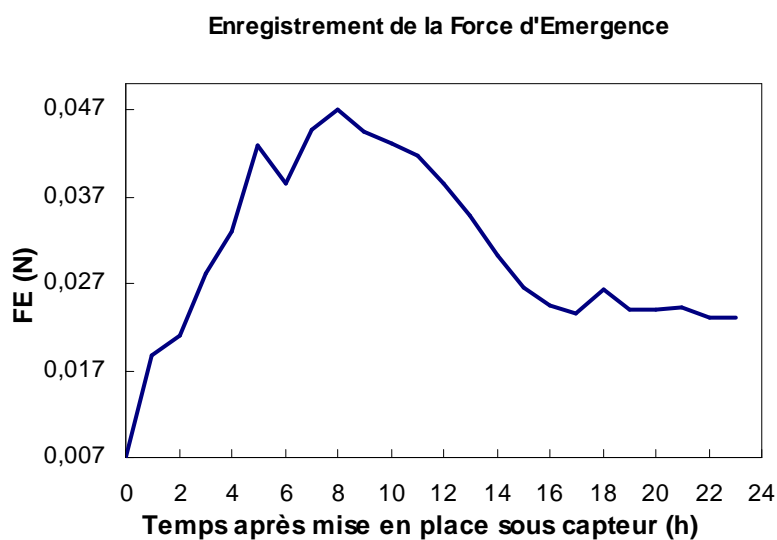


Figure 1.10 : Enregistrement de la Force d'Emergence (N, Newton) au cours du temps après mise en place sous capteur pour le génotype A17.

3.1 Forces d'émergence

3.1.1. Matériel et méthodes

Le dispositif de mesures est constitué de 10 capteurs de force (TME, type F108-03TC) disposés dans une enceinte climatique régulée à 20°C (Figure 1.9). A la base de chaque capteur est fixé un tube en plastique dans lequel le sommet de la plantule est inséré afin de la guider vers la zone d'appui du capteur. Les différents capteurs sont étalonnés de telle sorte que l'on connaisse la relation entre le signal enregistré (en mV) et la force (FE) exercée par la plantule sur la jauge du capteur. Les signaux sont enregistrés par une centrale d'acquisition (AOIP type SAM70) reliée à un ordinateur et une procédure permet le calcul automatisé et la visualisation de la force exercée au cours du temps d'application.

Il existe une corrélation intra- et inter-spécifique entre la masse de la semence et la valeur de la force mesurée (cf Introduction ; Tableaux 1.6 et 1.7). Dans un premier temps, pour évaluer l'effet du génotype indépendamment de la masse de la semence, les semences ont été choisies dans une même gamme de masses comprise entre 3 et 3.5 mg. Les graines préalablement scarifiées ont été semées dans des pots remplis de sable de Fontainebleau (SIFRACO qualité NE34: SiO₂ > 99.7%, densité 2.65, granulométrie moyenne 200 µm) à une profondeur de 1.5 cm. L'alimentation hydrique et minérale est assurée par un apport initial d'une solution nutritive (14 mmol.l⁻¹ N ; Saglio et Pradet, 1980) puis d'eau déminéralisée au cours de la mesure afin de maintenir une humidité non limitante de 0.20 g.g⁻¹. Les pots sont placés à l'obscurité à 20°C. Ces conditions générales de culture sont les mêmes que celles utilisées pour l'étude de la croissance hétérotrophe.

Chaque plantule est placée sous le capteur lorsqu'elle a atteint une longueur d'hypocotyle comprise entre 2.5 et 3 cm, ce qui correspond à 80-90 heures (45 à 60°Cj) après semis. Cette longueur et cette durée ont été choisies de façon à mesurer la force d'une plantule qui arriverait à la surface du sol et qui rencontrerait un obstacle à cette surface. La force exercée est enregistrée toutes les heures. Elle augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum, puis diminue. Un exemple d'enregistrement est donné à la figure 1.10 pour le génotype A17. A 20°C, le maximum (FE_{max}) est enregistré entre 10 et 24 heures après le moment où la contrainte a commencé à s'exercer sur le capteur. Trente mesures ont été réalisées (3 séries de 10 capteurs), avec 20 à 25 mesures finalement exploitables par génotype.

Enfin, un ensemble de mesures complémentaires a été réalisé. Une série de mesures (3 x 10) a été menée à 15°C pour évaluer l'effet de la température de 20 °C utilisée pour réaliser l'ensemble des autres mesures de force. Deux autres séries de mesures (3 x 10) destinées à évaluer l'effet de la masse des semences ont été faites : sur Paraggio avec des semences tout venant, sans les trier selon leur masse et sur un autre génotype, A20, choisi car présentant de plus fortes masses de semences.

Espèce	Masse semences (mg)	Force d'émergence (N)	Diamètre épi- ou hypocotyle (mm)	Auteurs
Luzerne cultivée (<i>Medicago sativa</i>)	2.5	0.15 - 0.20		Jensen et al. (1972) Williams (1956)
Trèfle (<i>Trifolium</i>)		0.09 - 0.12		Jensen et al. (1972)
Pois fourrager (<i>Vigna unguiculata</i>)	257	7		Sinha et Ghildyal (1979) Gerard (1980)
Soja (<i>Glycine max</i>)		1.3 - 1.9	2.2	Souty et Rode (1994b)
Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	200-350	3 - 4.3	3.1	Souty et Rode (1994b) Taylor et Ten Broeck (1988)
Betterave var. <i>Véga</i> (<i>Beta vulgaris</i>)	2.5-4 (sans péricarpe)	0.05 - 0.10	1	Souty et Rode (1993)
Carotte (<i>Daucus carota</i>)	1.5-2	0.04 - 0.10	1.5-2	Tamet et al. (1995)
Coton (<i>Gossypium</i>)	85	3.0 - 6.0	3-4	Gerard (1980)
Riz (<i>Oryza sativa</i>)	24	0.5	0.9	Sinha et Ghildyal (1979)
Maïs (<i>Zea mays</i>)	240-340	0.6 - 2.9	-	Souty et al. (1992)
Blé (<i>Triticum aestivum</i>)	140	3	1.8	Sinha et Ghildyal (1979)
	50	0.3	1.5	Bouaziz et Hicks (1990)

Tableau 1.6 : Masses des semences et forces d'émergence mesurées pour différentes espèces.

Espèce	Masse semences (mg)	Force d'émergence (N)
Betterave var. <i>Véga</i>	7-8.9 (2.3mg)*	0.07 (0.04)
	13-16 (3.4mg)*	0.08 (0.03)
Lin var. <i>Niagara</i>	8-8.9	0.14 (0.04)
Blé var. <i>Fidel</i>	30-39.9	0.37 (0.09)

Tableau 1.7 : Forces d'émergence mesurées (N, Newton) avec le même dispositif que pour *M.tr.* (Carrera, 2006).

* Masse sans le glomérule ; les écarts types de force d'émergence sont donnés entre parenthèses.

Génotype	Force d'émergence (N)	Nombre plantules
A17	0.074 (0.02) b	21
F83005.5	0.084 (0.03) ab	20
DZA315.16	0.071 (0.02) b	23
Paraggio	0.099 (0.04) a	23
Mesures complémentaires		
Paraggio 15°C	0.100 (0.04)	10
Paraggio tout venant (masse 5.2 mg)	0.122 (0.03)	22
A20 (masse 5.7 mg)	0.197 (0.01)	25

Tableau 1.8 : Forces d'émergence (N, Newton) mesurées pour chaque génotype de *M.tr.*
Les écarts types sont donnés entre parenthèses ; les lettres donnent le classement des génotypes par test de comparaison de moyennes (Bonferroni, au risque $\alpha=5\%$).

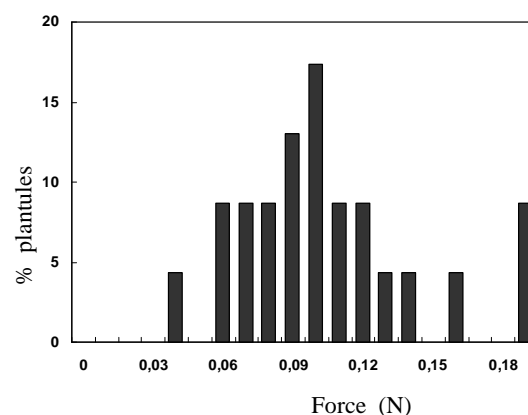


Figure 1.11 : Distribution des forces d'émergence (N, Newton) mesurées pour le génotype Paraggio.

3.1.2. Résultats et discussion

Les valeurs moyennes extrêmes de FE_{max} varient de 0.07 à 0.1 N, avec une valeur significativement plus élevée pour le génotype Paraggio (Tableau 1.8 ; Figure 1.11). Les autres génotypes présentent des forces moins élevées et de même ordre de grandeur. La série de mesures complémentaires réalisée sur des graines tout venant de Paraggio indique une force exercée significativement supérieure. Il en est de même pour les mesures réalisées sur le génotype A20 ayant une masse moyenne de semences encore plus élevée (Tableau 1.8). Les mesures réalisées à 15 °C montrent que la force maximum moyenne exercée est identique à celle mesurée pour Paraggio à 20°C.

Les valeurs de force obtenues pour *M. tr.* sont de l'ordre de celles obtenues pour des espèces aux masses de semences voisines (Tableaux 1.6, 1.7, 1.8). Les forces exercées par les différents génotypes ont été mesurées à même masse de semences. Le génotype Paraggio présente dans ces conditions une valeur de force plus élevée. Par ailleurs, les mesures complémentaires montre un effet de la masse des semences (Tableau 1.8). La relation est de type exponentiel (résultat non montré). Paraggio est une variété cultivée dont la force plus élevée est corrélée à la masse de la graine plus élevée. Cependant, cette force d'émergence élevée est aussi due à d'autres caractéristiques intrinsèques à ce génotype.

En conclusion, la force exercée par *M. tr.* s'avère assez faible et se situe dans la gamme des forces observées pour des espèces de même masse de semences. Il est apparu une variabilité entre génotypes : Paraggio à même masse de semences présente une force plus élevée. Par ailleurs, la force exercée est largement corrélée à la masse de la semence. Les génotypes à masse moyenne de semences plus élevée exercent donc une force plus importante sans que le mécanisme sous-jacent à cet effet ne soit élucidé.

3.2. Taux de plantules bloquées par les mottes

3.2.1. Matériel et méthodes

Les graines ont été semées dans un bac (24 par bac), sur une couche de terre fine tamisée à 5 mm, de masse volumique 1.0 kg.dm^{-3} . Les graines sont ensuite recouvertes d'une couche de 2 cm d'épaisseur de la même terre. Des mottes de diamètre connu (L, axe le plus long = 30, 40 ou 50 mm) sont posées sur la terre au-dessus de chaque graine, repérée précisément à l'aide de grilles. Ces mottes sont ensuite laissées à la surface, ou recouvertes de terre dans le cas des expérimentations avec mottes enfouies (Figure 1.12). La teneur en eau de la terre est maintenue à $0.18\text{-}0.20 \text{ g.g}^{-1}$ (-0.05 à -0.08 MPa pour le sol utilisé, conditions hydriques non limitantes) en recouvrant les bacs d'une feuille de papier d'aluminium. Chaque traitement (génotype x taille de mottes x position dans le lit de semences) est



Figure 1.12 : Dispositif expérimental pour les mesures de mortalité sous mottes posées.
Le dispositif pour les mesures de mortalité sous mottes enfouies inclut une couche supérieure de terre.

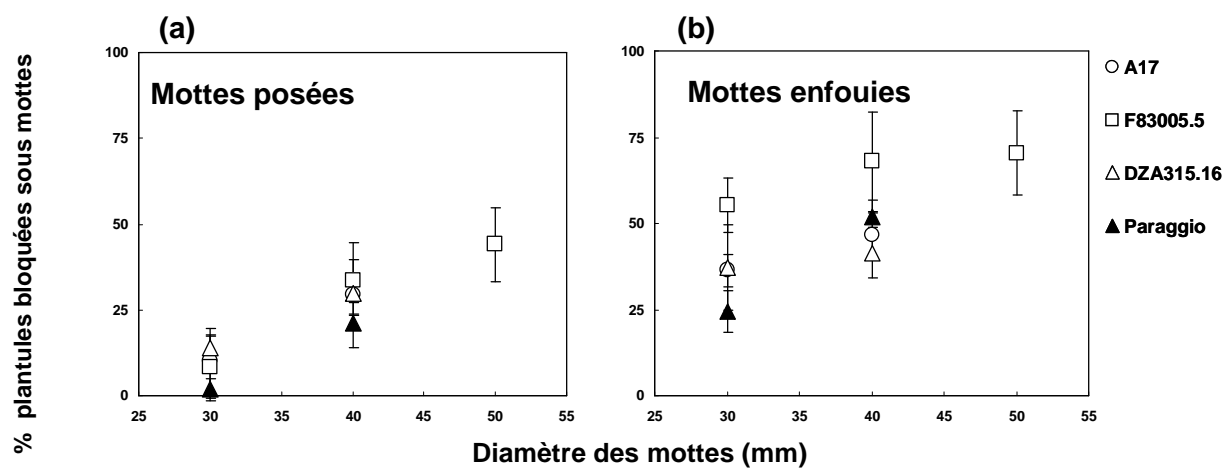


Figure 1.13: Pourcentages de plantules bloquées pour chaque géotype sous différentes tailles de mottes (a) mottes posées en surface, (b) mottes enfouies.

GENOTYPES		A17	F83005.5	DZA 315.16	Paraggio	
Paramètres de la fonction de probabilité de mortalité sous mottes	Mottes posées					
	α	mm ⁻¹	0.024	0.0258	0.025	0.0219
	L_0	mm	25.5	26	26	29.15
	Mottes enfouies					
	α	mm ⁻¹	0.0270	0.0360	0.0248	0.0251
	L_0	mm	15	10	15	15

Tableau 1.9 : Valeurs de paramètres de la fonction de probabilité de mortalité sous mottes pour les différents géotypes étudiés.

répété 3 fois, ce qui représente un total 72 plantules observées. Les bacs ont été placés dans une enceinte régulée à 20°C et les observations ont eu lieu environ 10 à 12 jours après semis. Le taux de plantes restées bloquées sous une motte a été mesuré grâce à l'ouverture frontale du bac permettant d'accéder aux plantes et de réaliser des observations en coupe verticale (micro-profils) du sol.

Les taux obtenus pour les différentes tailles de mottes selon leur position (surface ou enfouies) sont ajustés à l'équation :

$$P(L) = L_0 (1 - \exp(-\alpha L))$$

pour déterminer les valeurs des paramètres L_0 et α , qui sont les paramètres de la fonction de probabilité de mortalité sous mottes utilisée dans le modèle (cf Introduction Tableau In.1). Les taux de blocage obtenus sont comparés à même position et taille de mottes par un test de Tukey ($p=0.05$).

3.2.2. Résultats et discussion

La Figure 1.13 présente les pourcentages de plantules bloquées sous mottes enfouies et posées en surface. Le tableau 1.9 donne les valeurs de L_0 et α calculées pour les deux modalités de disposition et les différents génotypes. Les taux de plantules bloquées augmentent avec la taille des mottes et ces taux sont plus élevés dans le cas des mottes enfouies, quel que soit le génotype. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans le cas des espèces précédemment étudiées, cultivées ou adventices (Durr et Aubertot, 2001 ; Dorsainvil *et al.*, 2005 ; Moreau-Valancogne *et al.*, 2008 ; Gardarin *et al.*, 2008). Dans le cas des mottes posées il n'y a pas de différences significatives entre génotypes. Dans le cas des mottes enfouies, le génotype F83005.5 présente des taux de blocage significativement plus élevés et des valeurs de L_0 et α très différentes des autres génotypes.

3.3. Synthèse sur les différences entre génotypes face aux obstacles mécaniques

Les différentes mesures relatives aux effets des obstacles mécaniques étaient nécessaires pour compléter le paramétrage du modèle. Des différences de comportements entre génotypes ont été observées.

D'une part, le génotype Paraggio exerce une force d'émergence plus élevée. Cette force est en partie liée à sa masse de semences plus élevée. Une relation apparaît entre la masse moyenne des semences du génotype et la force exercée. Cette relation serait à établir sur une plus large gamme de masses pour différents génotypes de *M.tr.* étant donné qu'il existe des génotypes aux masses de semences sont plus importantes (jusqu'à une dizaine de milligrammes par semence).

D'autre part, F83005.5 présente le taux de plantules restant bloquées sous des mottes le plus élevé, dans le cas des mottes enfouies. Paraggio, malgré sa force d'émergence plus élevée, ne se distingue

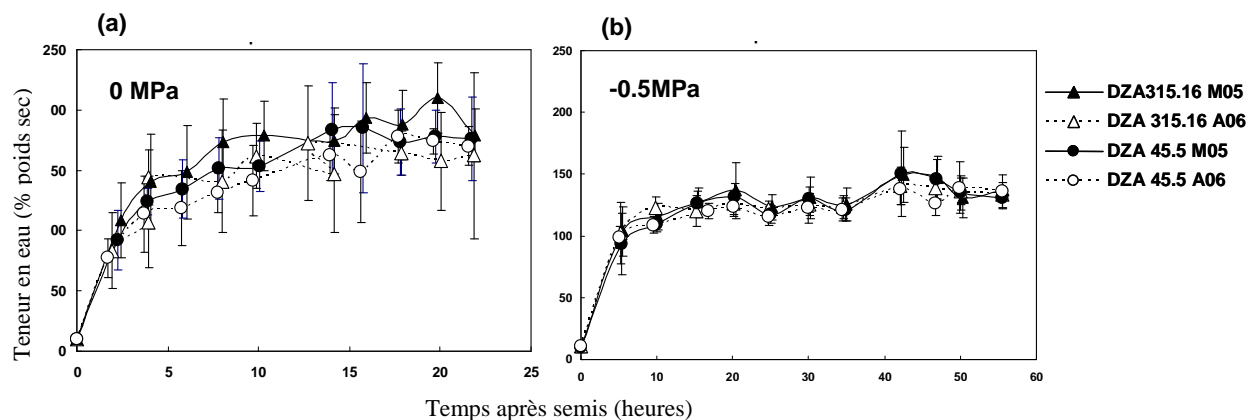


Figure 1.14: Cinétiques d'imbibition à (a) 0 MPa et (b) -0.5 MPa de deux géotypes ayant des potentiels hydriques de base contrastés (mesures sur les graines non germées à une date d'observation donnée).

DZA315.16 $\Psi_b = -0.72$ MPa (M-05) et $\Psi_b = -0.55$ MPa (A-06)

DZA45.5 $\Psi_b = -1.22$ MPa (M-05) et $\Psi_b = -1.21$ MPa (A-06)

pas des autres génotypes face à ce type d'obstacles. La différence de force de ce génotype n'est peut-être pas suffisante pour modifier le passage sous les obstacles considérés. En effet, le contournement des mottes n'est pas déterminé uniquement par la force : les mottes enfouies ne sont pas déplaçables car incluses dans le lit de semences. La morphologie de la plantule, plus précisément la largeur de la crosse de l'hypocotyle, pourrait influencer le risque que la plantule reste plantée dans une anfractuosité de l'obstacle. Le géotropisme négatif de l'hypocotyle fait qu'elle tend à pousser vers le haut, sans pouvoir retourner vers le bas. Une crosse étroite pourrait favoriser le risque de rester bloquée.

4. Synthèse générale

A l'issue de l'ensemble des mesures réalisées pour caractériser *Medicago truncatula*   l'aide des paramètres du modèle de levée, plusieurs conclusions peuvent être apportées :

- la distinction des deux étapes menant à l'émergence d'une plante, germination puis croissance hétérotrophe est nécessaire pour établir les réponses spécifiques de ces étapes aux différents facteurs environnementaux ;
- les lois de réponse établies permettent de décrire et de modéliser le fonctionnement de *M.tr.*, et de resituer cette espèce dans les gammes de valeurs établies pour d'autres espèces ;
- l'utilisation de diversité génétique provenant de la core collection de *M.tr.*, associée à la prise en compte d'éléments des biotopes naturels de certaines accessions, ainsi que de caractéristiques supposées influencer la valeur des paramètres étudiés (masse de la graine), ont permis de révéler de la variabilité g n typique sur les valeurs de ces paramètres. Cette démarche de choix de génotypes pour le phénotypage de *M.tr.* serait à poursuivre pour explorer une plus grande diversité ;
- les réponses aux facteurs environnementaux lors des différentes étapes montrent des différences significatives entre génotypes. Les différences observées peuvent reposer sur de très nombreux mécanismes et voies métaboliques. Il est important d'aborder l'analyse du déterminisme génétique, en ayant des éléments d'interprétation des différences constatées. Par exemple, dans le cas des différences de réponse au stress hydrique, la vitesse d'imbibition et la teneur en eau finale sont des variables pouvant expliquer des différences de vitesse et de taux de germination. Elles ont été mesurées sans révéler de différence entre génotypes (Figure 1.14). Il est apparu des différences importantes de composition en sucres solubles pour le génotype le plus tolérant au stress hydrique. Ce point reste à étayer et à éclairer. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Il peut s'agir de différences traduisant les conditions de remplissage et de maturation de la graine pour ce génotype, et qui seraient seulement corrélées à d'autres modifications à l'origine de la réponse au stress hydrique. Des modifications de composition des réserves peuvent aussi avoir des conséquences sur les propriétés physiques de la graine, et les conditions de son imbibition, alors que la vitesse d'imbibition ou les

teneurs en eau mesurées lors de l'imbibition ne sont pas modifiées. Enfin, on peut envisager que des modifications de mobilisation de ces réserves particulières pourraient influencer les premières étapes conduisant à la percée de la racine et favoriser une tolérance accrue au stress hydrique. Dans le cas des effets du froid au cours de la phase de croissance hétérotrophe, les travaux réalisés sur les variations d'allongement des organes d'une plantule (génotype, eau, éléments minéraux, températures ; Dürr, 2002) ont amené à mettre en cause des modifications d'allongement des cellules plus que des variations de leur nombre. Tester de telles hypothèses serait utile pour orienter la recherche des bases de génétique fonctionnelle.

Avant d'aborder la recherche de déterminisme génétique et de possibilité d'amélioration de tels caractères, il est important d'évaluer l'ampleur des effets des variations des paramètres sur un effet sur le résultat des levées. C'est le point que nous allons étudier au chapitre suivant.

CHAPITRE II

SIMULATION NUMERIQUE DES EFFETS DE LA DIVERSITE GENETIQUE SUR LA GERMINATION ET LA LEVEE SELON DIFFERENTES CONDITIONS DE SEMIS

CHAPITRE II. SIMULATION NUMERIQUE DES EFFETS DE LA DIVERSITE GENETIQUE SUR LA GERMINATION ET LA LEVEE DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE SEMIS

1. Objectifs et démarche

Dans cette deuxième partie, l'objectif est d'évaluer quelle ampleur de variations de germination et de levée est à attendre des différences génotypiques mises en évidence au cours du premier chapitre. De façon plus précise, l'objectif est de déterminer sur quels paramètres et dans quelles gammes de conditions environnementales les différences génotypiques ont des conséquences sur la germination et la levée.

Pour cela, nous avons réalisé un programme d'expérimentation numérique en utilisant le modèle SIMPLE. Cette étude est rendue possible par la caractérisation des génotypes, telle qu'elle a été présentée au chapitre précédent, sur la base des valeurs des paramètres du modèle. Cela permet de réaliser pour les différents génotypes, des simulations de germination et de levée dans différentes conditions de semis.

Un préalable nécessaire à l'utilisation du modèle pour réaliser une telle étude est d'apprécier la qualité de ses prévisions. Cela requiert de confronter des observations à des simulations obtenues dans les mêmes conditions environnementales. Il s'agit d'évaluer si le modèle permet à partir des valeurs de paramètres mesurées en conditions contrôlées au laboratoire, de prévoir les valeurs de germination et levée observées dans des conditions environnementales données. Cette évaluation permet d'identifier les sources d'écarts aux prévisions et de chiffrer ces écarts, sur chaque étape conduisant à la levée.

Puis, le modèle de prévision des levées SIMPLE a été utilisé pour un programme d'étude par simulations des levées des différents génotypes, dans différentes conditions de milieu. Nous avons utilisé un jeu de données climatiques disponible pour un climat de type tempéré sur la période 1994-2002, ce qui permet une première étude des variations de levées entre génotypes, sous l'effet de la variabilité naturelle du climat sur site donné.

Nous avons aussi créé des génotypes virtuels en rassemblant d'une part, un ensemble de valeurs des paramètres favorables aux deux étapes de germination et de levée, et d'autre part, des valeurs de paramètres *a priori* défavorables à la levée. Ce travail a pour objectif d'évaluer les effets conjugués sur la levée de tous les paramètres agencés de ces deux façons différentes. La construction de tels génotypes virtuels permet d'amplifier des différences génotypiques, de simuler des génotypes ayant des caractéristiques extrêmes susceptibles d'être recherchés par sélection, et d'évaluer l'ampleur des modifications résultantes pour la germination et la levée à l'aide du modèle. Nous avons ensuite cherché à identifier les caractéristiques des plantes qui influencent le plus fortement la réussite des levées selon les conditions environnementales rencontrées au cours de la

germination et de la levée. Pour cela, nous avons procédé à une analyse de sensibilité en modifiant successivement certains paramètres à partir de l'idéotype réunissant les valeurs de paramètres les plus favorables aux levées. Les valeurs données sont restées dans la gamme de la diversité observée sur les génotypes étudiés.

2. Evaluation du modèle

Avant d'utiliser le modèle pour réaliser des simulations, nous avons cherché à évaluer la qualité de ses prévisions en confrontant des observations en différentes conditions de milieu aux simulations obtenues dans ces mêmes conditions. Ce test des prévisions du modèle a déjà été réalisé sur d'autres espèces cultivées (betterave Dürr *et al.*, 2001 ; moutarde Dorsainvil *et al.*, 2005 ; haricot Moreau-Valancogne *et al.*, 2008). Il permet d'évaluer l'ordre de grandeur des écarts et leur sens de variation, d'identifier et de hiérarchiser des points d'amélioration du modèle (Wallach, 2006).

Pour cette évaluation, il faut donc disposer d'observations de germination et de levée pour les différents génotypes dans différentes conditions de milieu. Il est nécessaire de disposer de l'enregistrement précis de ces conditions de façon à les introduire dans le modèle, pour réaliser les simulations dans les mêmes conditions environnementales.

En nous appuyant sur les résultats présentés dans le Chapitre I, nous avons retenu les quatre génotypes aux comportements contrastés en fonction des étapes étudiées et des facteurs environnementaux, et pour lesquels les mesures complémentaires relatives aux effets des obstacles mécaniques ont été réalisées. Ces génotypes sont Jemalong A17, Paraggio, F83005.5 et DZA315.16.

Ces deux derniers génotypes présentent des comportements différents aux températures extrêmes, respectivement froides et supra-optimales. Nous n'avons pas retenu de génotype présentant un comportement différent sous l'effet du stress hydrique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, au moment de la mise en place de l'expérimentation de terrain, l'ensemble des résultats au laboratoire n'était pas acquis et les résultats mettant en évidence DZA045.5 comme génotype plus tolérant au stress hydrique, n'étaient pas disponibles. En outre, au moment de l'essai (automne, mi-octobre), les fluctuations thermiques étaient plus probables que l'occurrence d'un stress hydrique. Les expérimentations ont été réalisées avec les semences du lot A-06 car seul ce lot était en quantité suffisante.

Nous allons présenter les résultats du test du modèle dans le cas d'un essai mené au champ. Auparavant, nous présenterons deux expérimentations complémentaires, réalisées en terre dans des conditions de semis très simplifiées par rapport à un semis au champ, afin d'évaluer spécifiquement certains paramètres.

GENOTYPES			A17	F83005.5	DZA 315.16	Paraggio
GERMINATION						
Température de base <i>Tbgerm</i>		°C	1.8	1.7	0.9	1.9
Pourcentages de germination		0-7 °Cj	1	0	0	0
par classes de somme de		7-9 °Cj	5	1	0	0
temps thermiques (STT,		9-11 °Cj	13	1	0	3
calculée en utilisant la		11-13 °Cj	18	5	1	12
<i>Tbgerm</i>)		13-15 °Cj	18	17	5	21
		15-17 °Cj	14	23	13	21
		17-19 °Cj	10	19	18	16
		19-21 °Cj	7	12	18	11
		21-23 °Cj	4	7	14	6
		23-25 °Cj	2	4	10	4
		>25 °Cj	4	4	19	6
Pourcentage de non germées		%	4	7	2	0
Potentiel hydrique de base		MPa	- 0.7	- 0.75	- 0.55	- 0.6
<i>Ψbgerm</i>						
CROISSANCE HETEROTROPHE						
Température de base		°C	7.1	6.6	3.1	5.6
d'allongement <i>Tball</i>						
Paramètres de la fonction	<i>a</i>	mm	65.9	68.9	64.5	86.5
d'élongation	<i>b</i>	°Cj ⁻¹	0.04	0.03	0.01	0.02
	<i>c</i>		1.97	1.28	1.29	1.47
OBSTACLES MECANIQUES						
Paramètres de la fonction de	Mottes enfouies					
probabilité de mortalité sous	<i>α</i>	mm ⁻¹	0.0270	0.0360	0.0248	0.0251
mottes	<i>L₀</i>	mm	15	10	15	15
	Mottes posées					
	<i>α</i>	mm ⁻¹	0.024	0.0258	0.025	0.0219
	<i>L₀</i>	mm	25.5	26.0	26.0	29.15
Fréquence des forces		<0.04 N	0	0	5	5
d'émergence par classes de		0.04-0.07 N	47	31	40	15
forces (%)		0.07-0.1 N	47	38	45	35
		0.1-0.13 N	6	12	10	25
		>0.13 N	0	19	0	20
Coefficient de franchissement	<i>p</i>	%	40	40	40	50
d'une croûte						

Tableau 2.1 : Valeurs des paramètres d'entrée de SIMPLE récapitulées pour les quatre génotypes utilisés (lot A-06).

2.1. Evaluation du paramétrage des modules de prévision de la germination et de l'allongement

Nous avons réalisé une série limitée d'expérimentations dans de la terre sur le géotype Paraggio, en contrôlant les conditions de température et de teneur en eau pour tester la validité de certains des paramètres établis en conditions de laboratoire, très différentes des conditions de semis au champ. Plus précisément, les objectifs de ces expérimentations étaient de comparer :

- les cinétiques de germination obtenues sur solution de PEG aux cinétiques obtenues pour différentes teneurs en eau dans le sol. Théoriquement les potentiels hydriques annoncés avec le PEG et pour une certaine teneur en eau du sol sont identiques, mais nous avons voulu vérifier ce point en comparant les vitesses de germination obtenues. La méthode sur buvard avec des solutions de PEG est couramment utilisée au laboratoire (Gummerson, 1986 ; Dahal et Bradford, 1994 ; Masin *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006). Aucun de ces travaux n'a toutefois comparé la germination ainsi mesurée à celle de semences placées en terre ;
- les résultats de germination et de levée obtenus dans des conditions optimales avec les résultats obtenus par simulation dans les mêmes conditions : semis en terre à température constante optimale et humidité non limitante. Cela permet une première évaluation des paramètres donnés au modèle dans des conditions de milieu très simplifiées.

A chaque étape, les résultats expérimentaux ont été comparés aux simulations obtenues en entrant comme conditions de semis les conditions de température, de teneur en eau, de profondeur de semis et de structure du sol des expérimentations en bac. Les valeurs données aux paramètres pour le géotype testé (Paraggio) sont récapitulées au tableau 2.1.

2.1.1. Matériel et méthode

L'ensemble des expérimentations a été réalisé en bacs avec le même sol de texture argilo-limoneuse (0.17 g.g^{-1} argile, 0.75 g.g^{-1} limons, 0.4 g.g^{-1} sable), tamisé à 5 mm. La masse volumique des couches de sol constituées est de 1.0 kg.dm^{-3} , c'est-à-dire voisine de celle obtenue dans les lits de semences au moment du semis. La relation teneur en eau - potentiel hydrique du sol utilisé a été établie au laboratoire (Sillon *et al.*, 2003). La teneur en eau du sol était de $0.19 \pm 0.01 \text{ g.g}^{-1}$ (soit -0.07 MPa pour le sol utilisé) lorsque l'on a cherché à se placer en conditions hydriques non limitantes pour la germination et l'allongement de la plantule. Les différents potentiels testés pour la comparaison avec les solutions de PEG étaient de -0.03 MPa (0.22 g.g^{-1}), -0.08 MPa (18 g.g^{-1}) et -0.23 MPa (14 g.g^{-1}).

Pour chaque expérimentation portant sur la germination, trois bacs (40 x 30 x 10 cm) ont été remplis d'une couche de terre tamisée de 4 cm d'épaisseur, sur laquelle ont été semées 7 lignes de 30 graines scarifiées, espacées de 5 cm entre elles et précisément repérées sur le côté latéral des bacs. Les graines ont été recouvertes d'une couche de terre tamisée d'une épaisseur de 2 cm environ. Les bacs ont été fermés à l'aide d'une couche de papier aluminium pour éviter les pertes d'eau et placés dans un incubateur à 15°C (température contrôlée à pas de temps horaire). Les cinétiques de germination ont été établies à partir de 7 dates d'observations successives. A chaque date d'observation, les graines de la première ligne accessible par l'ouverture frontale des bacs, sont récupérées et observées pour établir le taux de germination. Le bac est ensuite hermétiquement refermé jusqu'à l'observation suivante. La teneur en eau mesurée à chaque date d'observation indique que les pertes ont été très faibles (en moyenne $0.01 \pm 0.005 \text{ g.g}^{-1}$).

L'observation des levées a été réalisée dans les mêmes types de bacs, la terre étant à une teneur en eau de $0.19 \pm 0.01 \text{ g.g}^{-1}$. Dans ces bacs, 44 graines ont été semées à espace régulier. Puis, les bacs ont été placés dans une chambre de culture à 20°C. Les levées ont été relevées tous les un à deux jours jusqu'à ce que le nombre de plantules levées atteigne son maximum, entre 11 et 15 jours après semis. La profondeur de placement des graines est vérifiée *a posteriori* en ouvrant les bacs (moyenne $20.3 \pm 1.6 \text{ mm}$).

2.1.2. Calculs statistiques

Pour évaluer les écarts entre observations (O_i) et simulations (P_i), les critères statistiques suivants ont été calculés, n étant le nombre de dates d'observations pour une expérimentation et donc une cinétique donnée (Smith *et al.*, 1996) :

- efficience du modèle (EF) :

$$EF = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2}$$

sa valeur est comprise entre $-\infty$ et 1 (dans ce dernier cas, les écarts au modèle sont alors nuls) ;

- erreur de prédiction moyenne (RMSE, root mean square error) :

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2 / n}$$

l'unité de cet indice est celle de la variable analysée (% de germination ou de levée).

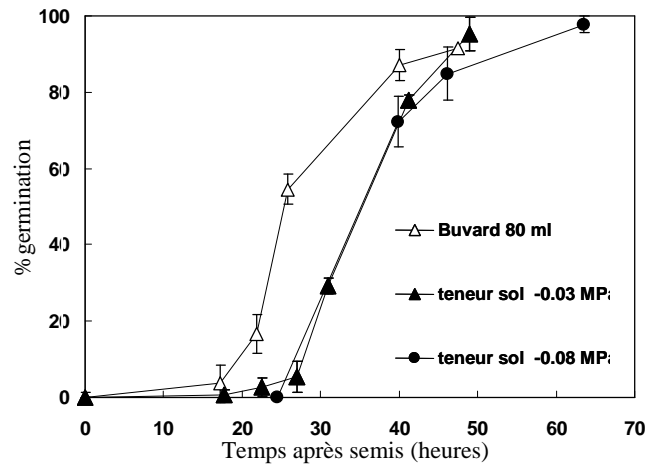
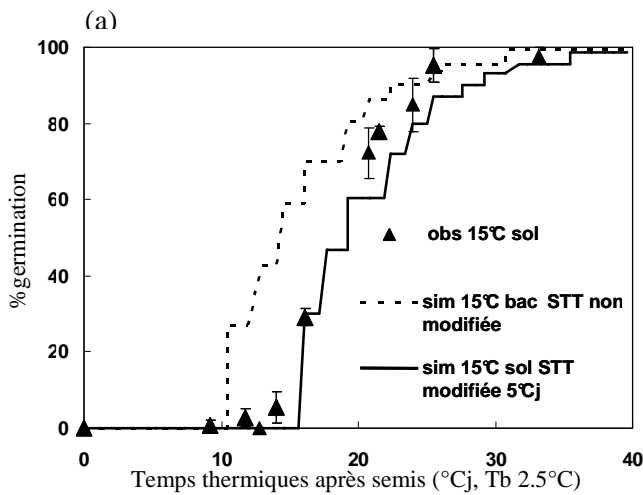


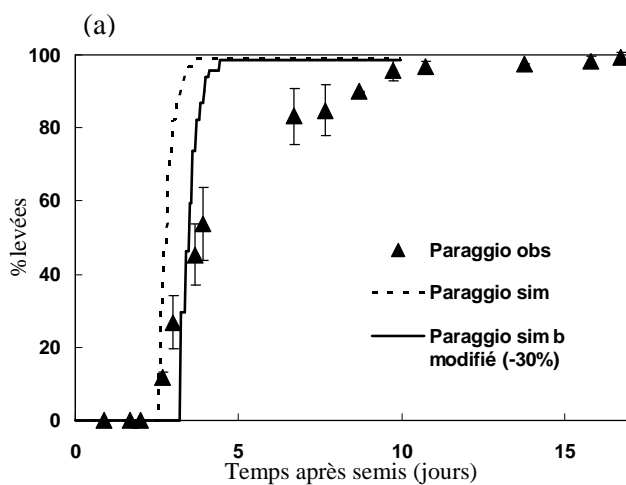
Figure 2.1 : Cinétiques de germination dans la terre et sur buvard à différentes teneurs en eau et potentiels hydriques (géotype Paraggio, 15°C).



(b)

Critère	STT non modifiée	STT augmentée de 5°Cj
EF	0.69	0.96
RMSE	22.20	8.25
CRM	-0.46	0.16

Figure 2.2 : (a) Cinétiques de germination observées à 15°C dans la terre (-0.03 et -0.08MPa) et simulées avec ou sans décalage de 5°Cj imposés aux distributions des temps de germination (b) valeurs des critères statistiques calculés (STT : Somme de Temps Thermiques).



(b)

Critère	b_{elon} non modifié	$b_{elon} - 30\%$
EF	0.36	0.75
RMSE	31.30	20.60
CRM	-0.47	-0.15

Figure 2.3 : (a) Cinétiques de levée observée et simulées avec et sans diminution du paramètre b_{elon} de la fonction d'allongement et (b) valeurs des critères statistiques calculés.

- indice CRM (coefficient of residual mass) :

$$CRM = \left(\sum_{i=1}^n O_i - \sum_{i=1}^n P_i \right) / \sum_{i=1}^n O_i$$

une valeur négative de cet indice indique que la majorité des valeurs prédites est supérieure à celles mesurées et inversement pour une valeur positive

2.1.3. Résultats

Les cinétiques observées dans les bacs en terre sont identiques aux teneurs en eau de 0.22 (-0.03 MPa) et 0.18 g.g⁻¹ (-0.08 MPa) correspondant à des potentiels proches de la valeur nulle, supposée non limitante (Figure 2.1). Cependant, lorsque l'on compare ces cinétiques à celles réalisées sur buvard (Figure 2.1), la cinétique de germination est un peu plus rapide sur buvard que celles observées dans de la terre à potentiel non limitant. Le décalage entre les cinétiques est de l'ordre de 5 à 9 heures au cours de la cinétique. Sur buvard (avec apport de 80 ml d'eau), la surface de contact des semences avec l'eau est plus importante : un film d'eau libre est observé au contact des graines, ce qui pourrait expliquer l'écart par rapport à la terre. Le même ordre de grandeur d'écart a été observé pour des expérimentations à des potentiels plus faibles, comparant buvard et terre (- 0.23 MPa, résultat non montré). Les cinétiques sur buvard sont donc plus rapides qu'en terre, quelque soit le potentiel testé. Pour tenir compte de ce décalage, également observé pour d'autres espèces étudiées dans les mêmes conditions (i.e. colza et pois, résultats non publiés), et simuler ce qui se produit en conditions de semis en terre, nous avons retenu d'utiliser la distribution des temps thermiques de germination observée en terre. La cinétique obtenue au laboratoire (Tableau 2.1, distribution des classes de temps thermiques) a été décalée de 5°Cj, (estimés en tenant compte de la température de cette expérimentation). La simulation obtenue sur la base de ce paramétrage est alors de très bonne qualité (Figure 2.2). Nous avons tenu compte de ce résultat pour toutes les simulations réalisées par la suite, en décalant de la même valeur (5°Cj) les distributions de germination données à chaque génotype.

La comparaison entre la cinétique de levée observée en bacs de terre en conditions optimales et la cinétique simulée dans les mêmes conditions montre que la cinétique simulée est un peu plus rapide que la cinétique observée, en particulier en fin de courbe (Figure 2.3). Les paramètres qui peuvent être en cause ne portent que sur la fonction d'allongement étant donné que la germination est bien simulée. L'allongement de la plantule en terre paraît moins rapide que dans les conditions de laboratoire où elles ont été établies (semis en pots en l'absence totale de contrainte mécanique cf. Chapitre I). En diminuant le coefficient b_{elon} de la fonction d'allongement de 30% par rapport à sa valeur initiale, la prévision est améliorée (critères EF, RMSE, CRM Figure 2.3). Cette correction a aussi été nécessaire lors du paramétrage et du test du modèle sur d'autres espèces (moutarde, Dorsainvil *et al.*, 2005 ; haricot, Moreau-Valancogne *et al.*, 2008), la même ampleur de décalage ayant été constatée.

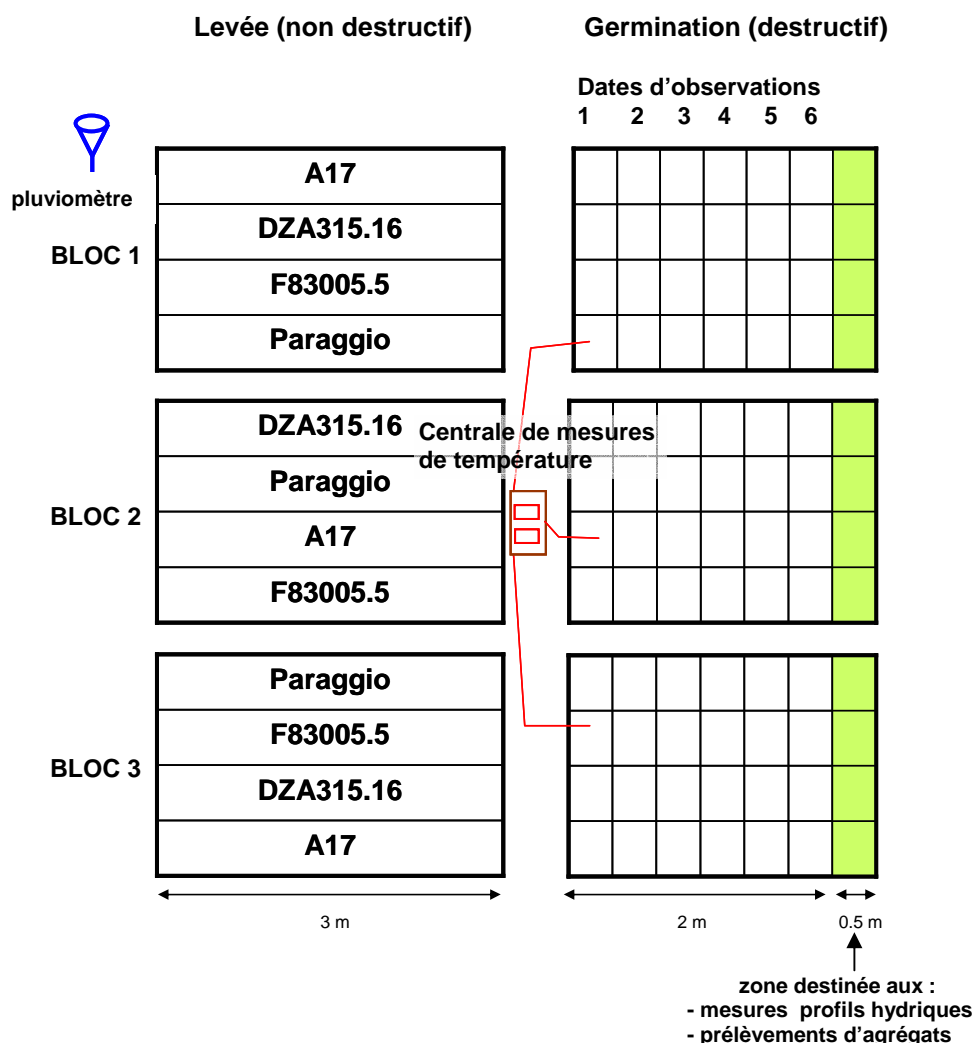


Figure 2.4 : Plan du dispositif expérimental de l'essai au champ

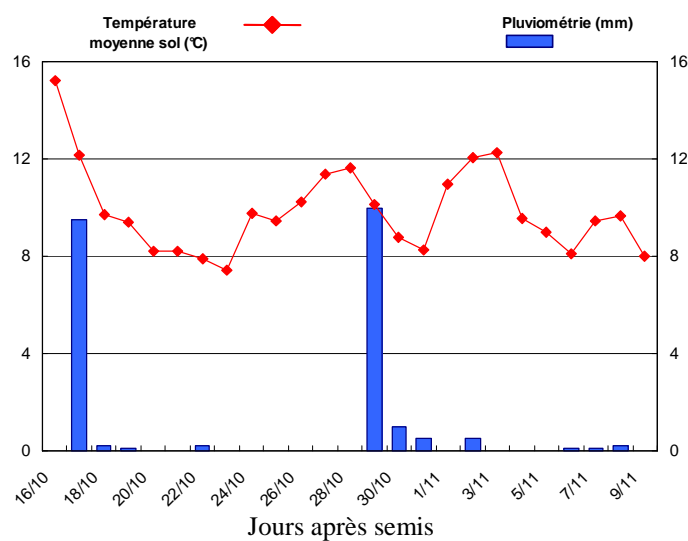


Figure 2.5 : Température moyenne du sol et pluviométrie à partir du jour de semis

2.2. Evaluation des prévisions du modèle

Pour évaluer les prévisions du modèle en conditions proches de celle d'un semis, une expérimentation a été menée au champ. Les observations de germination et de levée ainsi obtenues ont été comparées aux simulations réalisées dans les mêmes conditions, en paramétrant le modèle avec les valeurs mesurées au laboratoire pour chaque génotype (Tableau 2.1). Nous avons appliqué les ajustements proposés à l'issue des tests en conditions contrôlées : augmentation de 5°Cj pour chaque classe de temps mis pour germer ; diminution de 30% du coefficient b_{elon} de la fonction d'allongement. Les conditions climatiques (température et humidité du sol, pluviométrie), les caractéristiques du lit de semences (distribution des profondeurs de semis, taille et distribution des tailles d'agréats) et leur évolution sous l'action des pluies (formation d'une croûte de surface) ont été enregistrées et fournies au modèle comme variables d'entrée caractérisant les conditions de semis.

2.2.1. Dispositif et protocole expérimental

Le semis a été réalisé le 16 octobre 2007 sur la parcelle expérimentale de la SNES. Le sol est de type sablo-limoneux (0.15 g.g⁻¹argile, 0.40 g.g⁻¹limons, 0.45 g.g⁻¹sable). Le dispositif expérimental comptait trois blocs pour les observations de germination et de levées (Figure 2.4). Le sol a été préparé par deux passages de rotavator, puis un sillon a été ouvert au niveau de chaque ligne. Les graines préalablement scarifiées, ont été semées manuellement à intervalle de 3 cm et à environ 2 cm de profondeur puis recouvertes de terre au râteau. Dans chaque bloc, 100 graines ont été semées par génotype. Chaque bloc comportait quatre lignes de semis, une par génotype. Une partie a été utilisée pour caractériser le lit de semences et réaliser le suivi destructif de la germination. Une autre partie a été consacrée au suivi des levées puis aux observations finales destructives des causes de non-levées à la fin des levées.

Les observations ont été réalisées sur une période d'un mois environ entre le semis et la fin des levées. Pour chacune des six dates d'observation des germinations, 20 à 30 semences par génotype (10 par bloc) ont été observées en ouvrant un micro-profil à hauteur de la graine pour enregistrer sa profondeur de semis et son état (germée ou non). Les profondeurs de semis mesurées ont été en moyenne de 16 ± 4 mm (Tableau 2.2 ; Figure 2.7). Les observations de plantes levées ont été ensuite réalisées sur les trois blocs tous les 1 à 2 jours environ. Les causes de non levées ont été observées à la fin des levées sur 45 individus (15 par bloc) par génotype, en distinguant les graines non germées, les plantules anormales (aspect trapu et tordu, apparence vitreuse), les plantules bloquées sous mottes et les plantules bloquées sous croûte.

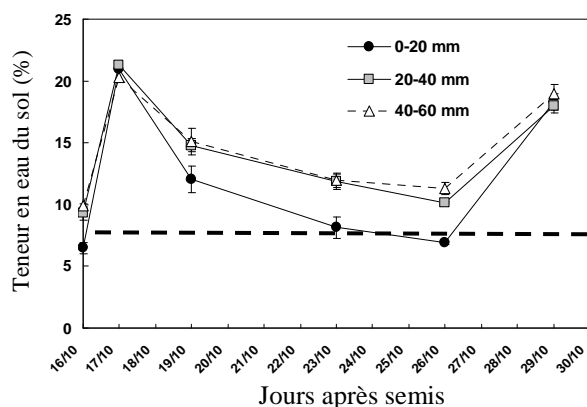


Figure 2.6 : Teneurs en eau dans le lit de semences à partir du jour de semis

La droite en pointillés matérialise la teneur en eau correspondant à un potentiel hydrique de -0.7 MPa pour ce sol.

Géotype	A17	F83005.5	DZA315.16	Paraggio
Profondeur (mm)	14.6 (5.5)	16.9 (3.2)	16.9 (4.2)	15.6 (4.8)

Tableau 2.2 : Profondeurs de semis.

Les nombres entre parenthèses représentent les écart-types sur 3 blocs.

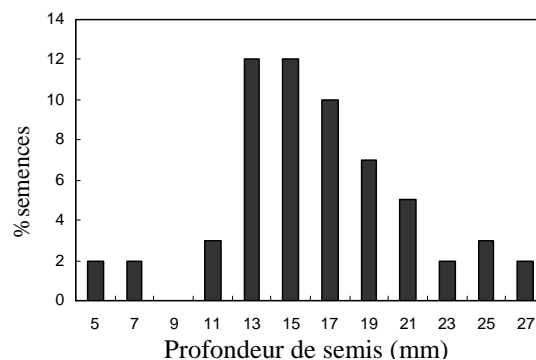


Figure 2.7 : Exemple de distribution des profondeurs de semis (Paraggio).

Taille des mottes (mm)	A17	F83005.5	DZA315.16	Paraggio
30-40	0 (0)	0 (0)	0.1 (0.2)	0 (0)
20-30	0.3 (0.4)	0.5 (0.3)	0.5 (0.5)	0.9 (0.6)
10-20	13 (1.8)	13 (2.2)	14 (1.6)	13 (1.7)
5-10	87 (2.0)	86 (2.1)	86 (1.5)	86 (1.1)

Tableau 2.3 : Granulométrie du lit de semences (pourcentage en masse de l'échantillon de chaque classe de taille de mottes). Les nombres entre parenthèses représentent les écart-types entre blocs.

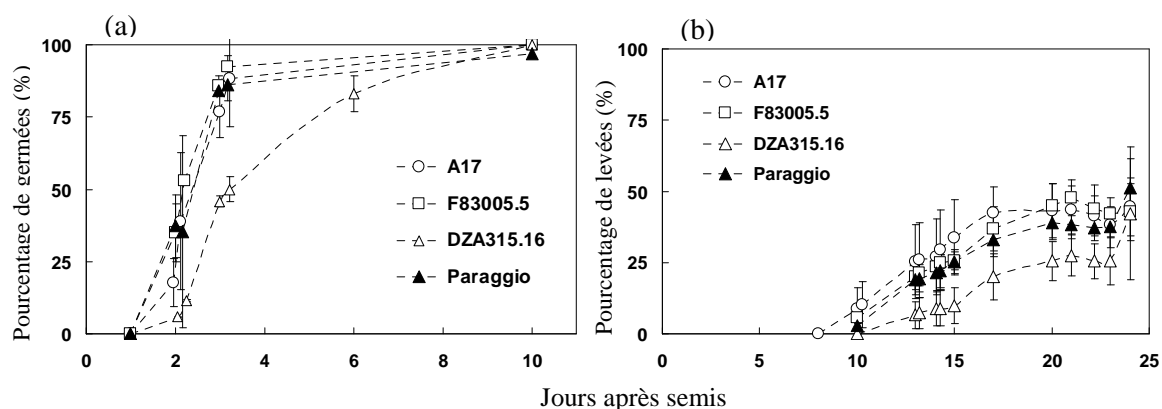


Figure 2.8 : Cinétiques (a) de germination et (b) de levée des quatre génotypes observées au champ.

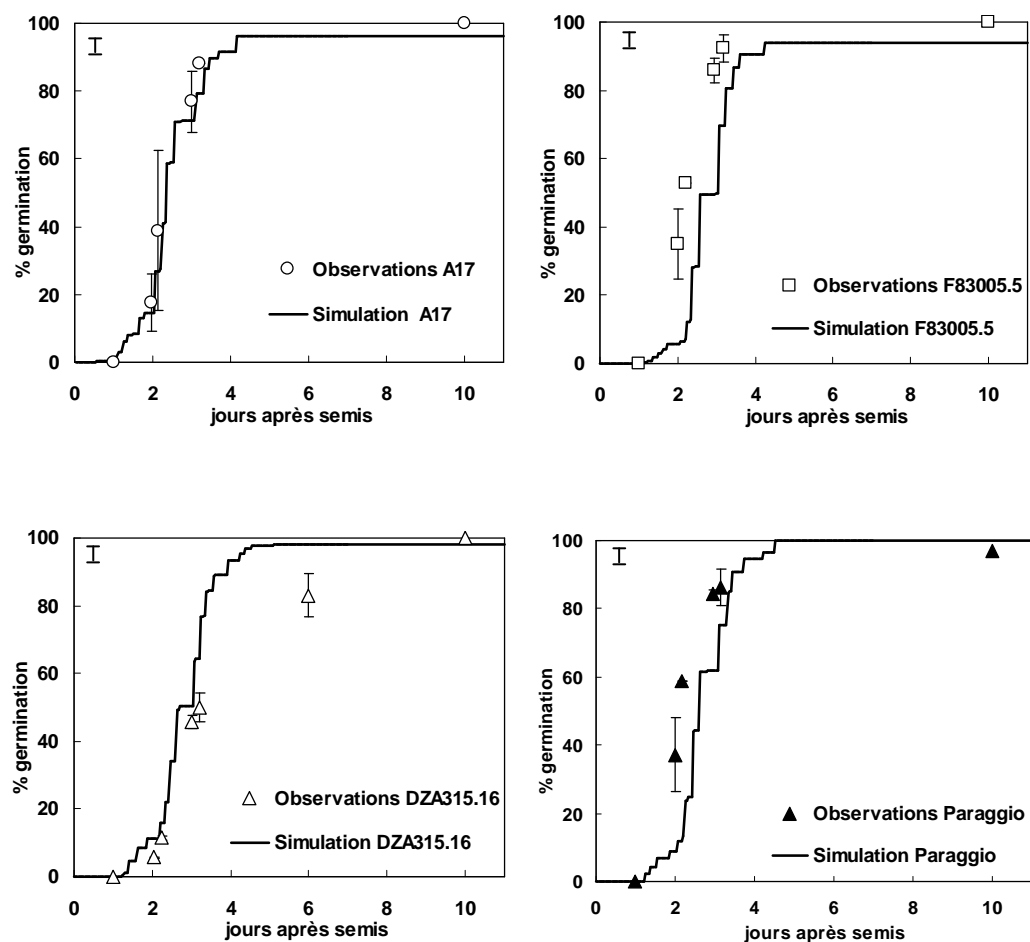
La pluviométrie (pluviomètre manuel) et la température du sol à 2 cm environ (sonde Testo, type 177-T3, une par bloc) ont été enregistrées (Figure 2.5). La teneur en eau du sol a été mesurée par gravimétrie deux fois par semaine (1 répétition par bloc) depuis la surface jusqu'à 10 cm de profondeur, avec un pas de 2 cm (Figure 2.6). En utilisant la texture du sol, une relation entre la teneur en eau et le potentiel hydrique du sol a été estimée (Service Infosol, INRA Orléans). La structure du lit de semences a été établie en prélevant des échantillons le jour du semis (5 x 20 x 5 cm, 1 échantillon par bloc) et en les tamisant après séchage lent à l'air libre (Tableau 2.3). Le lit de semences obtenu était le même pour les différents génotypes et assez fin (taille de mottes maximum de l'ordre de 20-30 mm). Enfin, un suivi photographique et visuel a été réalisé pour établir l'évolution de l'état de surface et la formation de croûte en surface. La pluie subie au deuxième jour après semis a provoqué l'apparition d'une croûte de type structural qui s'est ensuite desséchée ; la seconde pluie (14 jours après semis) a accru la dégradation, la croûte étant alors pour 50% de sa surface devenue sédimentaire. Les critères statistiques de comparaison simulées/observées sont les mêmes que ceux utilisés au paragraphe précédent.

2.2.2. Résultats

• *Observations*

Les cinétiques de germination observées au champ sont rapides, 80% des graines sont germées en 3 jours, et les taux finaux compris entre 95 et 100% (Figure 2.8 a). Seul le génotype DZA315.16 présente un retard significatif par rapport aux autres génotypes. Le lit de semences était très sec le jour du semis et les semences étaient le plus souvent placées dans les deux premiers centimètres, près de la surface (Figures 2.5 et 2.6 ; Tableau 2.2). Même si les cinétiques de germination sont rapides, elles ont été vraisemblablement retardées : la germination d'un grand nombre de graines n'a pu commencer que le second jour après la pluie enregistrée et la réhumectation des premiers centimètres (Figures 2.5 et 2.6).

Les cinétiques de levée sont lentes et le taux final enregistré faible (Figure 2.8 b). A nouveau, le génotype DZA315.16 se démarque nettement des autres génotypes par une cinétique plus lente et un taux final un peu plus faible. Les premières levées sont observées environ 10 jours après semis. A partir du 20^{ème} jour environ, les cinétiques atteignent un plateau. Les légères diminutions observées pour les deux avant-derniers points de mesure sont dues à des plantules sectionnées par les oiseaux et à des plantules mortes après levée. Leur taux a pu être estimé au moment des observations destructrices de non-levées, et nous avons ré-estimé le taux final (dernier point de la cinétique) en tenant compte des pertes post-levée. Les taux finaux varient de 42 à 50% (différences non significatives en raison du mode d'estimation du point final).



Critères	A17	F83005.5	DZA315.16	Paraggio
EF	0.97	0.47	0.94	0.60
RMSE (%)	7.50	28.30	8.50	21.10
CRM	0.10	0.34	-0.14	0.26

Figure 2.9 : Cinétiques de germination observées et simulées pour chaque génotype lors de l'essai réalisé au champ et valeurs des critères statistiques calculés.
 Les barres verticales sur les points observés représentent l'écart-type sur les 3 blocs. La barre verticale en haut à gauche du graphe représente l'écart-type moyen sur 3 simulations répétées.

• Simulations

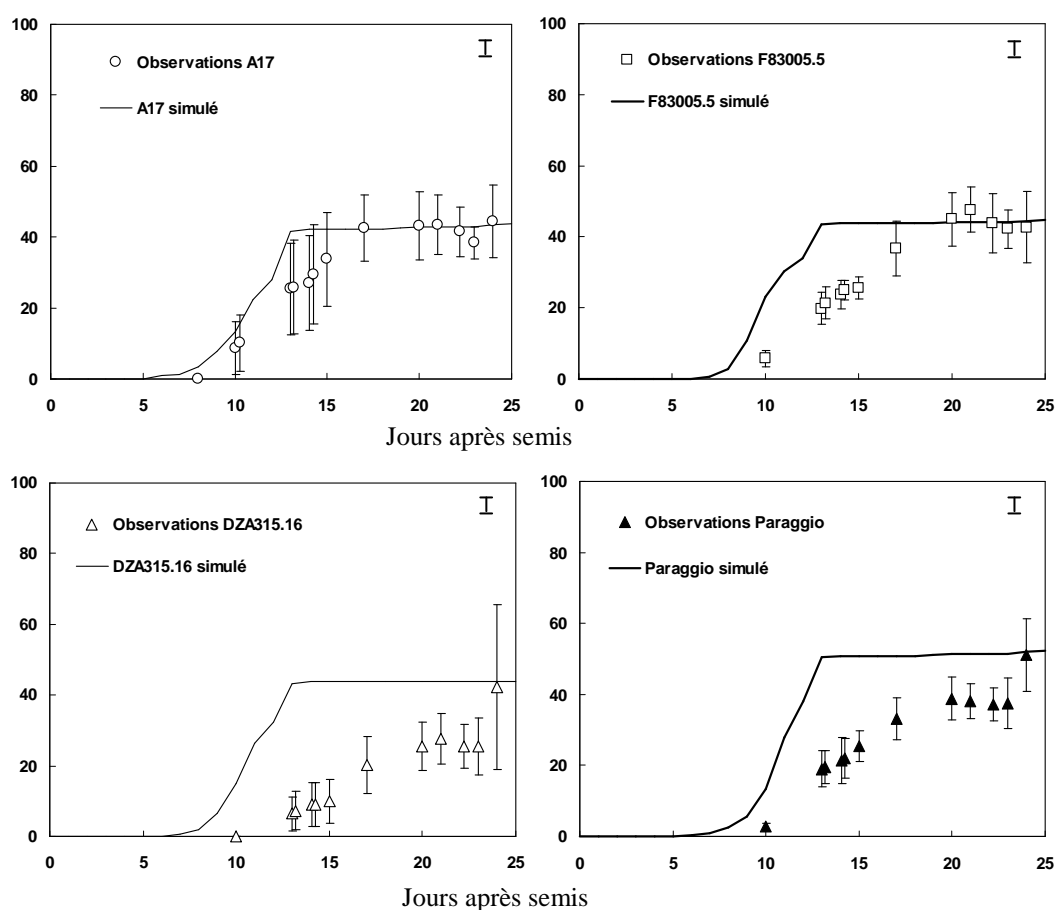
Les cinétiques de germination simulées sont proches des cinétiques observées (Figure 2.9). Le génotype A17 présente les résultats les plus proches des observations (EF 0.97). Le décalage de début des germinations dû au stress hydrique est bien prévu. Aucune germination n'est simulée le premier jour après semis alors que la température moyenne l'aurait permis. La germination n'est pas possible en raison du potentiel hydrique très faible (inférieur au potentiel hydrique de base) de l'horizon où se trouvent les semences. L'écart en temps pour la prévision reste ensuite inférieur à la demi-journée, même si les écarts en % de germination peuvent être élevés (valeur des RMSE) étant donné la germination très rapide de *M.tr.* et donc la très forte pente des courbes. De plus, le classement des écarts entre génotypes est restitué.

Cette confrontation aux observations permet de conclure que le formalisme donné à **la modélisation de la germination**, en tenant compte d'une part de conditions fluctuantes de potentiel hydrique et de température, d'autre part de la distribution des profondeurs de graines dans le lit de semences, ainsi que **le paramétrage donné aux différents génotypes**, permettent des prévisions de bonne qualité. Cette bonne prévision obtenue dans le cas de *M.tr.* a déjà été observée lors du test du modèle pour d'autres espèces cultivées.

Les cinétiques de levées simulées sont comparées aux observées dans la figure 2.10. Les taux finaux de levées simulés sont faibles et proches de ceux observés, en particulier si l'on prend en compte le dernier point estimé qui tient compte des pertes post-levées. Les allures des cinétiques simulées et observées sont de même type, mais des écarts importants apparaissent. Le génotype A17 présente à nouveau les écarts les plus faibles (EF 0.72). Les écarts au modèle sont importants pour les autres génotypes (valeurs de EF) et les simulations présentent une avance systématique sur les observations (CRM positifs). La cinétique prévue pour DZA315.16 présente l'avance la plus élevée.

Ces écarts importants peuvent s'expliquer par les valeurs de T_{ball} , moins bien estimées pour le lot A-06 (calcul à partir de deux températures seulement, Chapitre I). Ces décalages pourraient aussi être dus à un paramétrage de la fonction d'allongement (coefficient b_{elon}) encore trop favorable par rapport à la réalité, dû à une sous estimation du frein créé par la résistance mécanique du milieu. Outre la croûte de surface, les deux pluies intenses survenues au cours de la levée ont pu aussi augmenter fortement la compacité des premiers centimètres de ce sol assez sableux.

Enfin, les résultats donnés par le modèle permettent de confronter les causes de non-levées simulées à celles observées (Tableau 2.4). La principale cause de non-levées observée est le blocage de plantules sous croûte. Les taux observés de semences non-germées ainsi que de plantules bloquées sous mottes sont faibles. Il apparaît un taux assez important (5-15%) de plantules trapues, vitreuses. Ce faciès est observé pour d'autres espèces en cas de températures très froides pendant les levées avoisinant la température de base (semis précoces au printemps, tardifs à l'automne).



Critère	A17	F83005.5	DZA315.16	Paraggio
EF	0.72	-1.94	-3.83	-1.12
RMSE	8.40	21.60	27.6	18.86
CRM	-0.06	-0.80	-1.6	-0.52

Figure 2.10 : Cinétiques de levées observées et simulées pour chaque génotype observé au champ et valeurs des critères statistiques calculés pour les cinétiques de levées observées et simulées pour chaque génotype lors de l'essai réalisé au champ.
Les barres verticales sur les points observés représentent l'écart-type sur les 3 blocs. La barre verticale en haut à droite du graphe représente l'écart-type moyen sur 3 simulations répétées.

Causes de non levées (%)	A17		F83005.5		DZA315.16		Paraggio	
	Obs	Sim	Obs	Sim	Obs	Sim	Obs	Sim
Non germées	0 (0)	4 (0.4)	0 (0)	7 (0.6)	0 (0)	2 (0.5)	3 (5.5)	0 (0)
Mottes	4 (3.2)	1 (0.2)	1 (2.2)	4 (1.1)	2 (2.9)	1 (0.1)	0 (0)	1 (0.5)
Croûte	54 (3.1)	58 (0.7)	52 (4.4)	54 (1.9)	57 (11.5)	58 (1.5)	46 (7.8)	49 (2.5)
Anormales trapues vitreuses	5 (1.4)	-	4 (0.3)	-	16 (6.6)	-	13 (5.3)	-

Tableau 2.4 : Causes de non levées observées (Obs) et simulées (Sim).
Les nombres entre parenthèses représentent les écart-types entre blocs

Un tel épisode s'est effectivement produit pendant 4 jours (du 20 au 24 octobre) après la germination pendant la phase d'allongement sous terre (Figure 2.5). La comparaison de ces observations aux causes prévues par le modèle montre que les causes de mortalité sont relativement bien prévues. Le taux de plantules restées bloquées sous mottes est faible étant donné que le lit de semences était peu motteux : le modèle reproduit bien l'effet de ce lit de semences sur le taux de blocage des plantules. Le taux de non-germées a tendance à être surestimé par le modèle : cela est dû aux taux de non-germées résiduels (observées au laboratoire quelque soit les conditions de germination), qui fait partie des paramètres des génotypes (Tableau 2.1) et qui s'avèrent plus élevés que ceux observés au champ. Les taux de plantules bloquées sous croûte sont très élevés, ce que reproduit le modèle. Les taux observé et simulé pour Paraggio sont inférieurs de l'ordre de 10% comparé à ceux des autres génotypes. La force d'émergence plus élevée de ce génotype, qui est le paramètre d'entrée relatif au franchissement des croûtes, le distingue des autres génotypes : cela s'avère bien reproduire la différence de comportement de ce génotype sur le terrain. Par contre, le taux de plantules anormales observé n'est pas simulé par le modèle. Cela peut expliquer une partie des écarts entre observations et simulations tout au long de la cinétique dans le cas de DZA315.16 et Paraggio. Un tel effet des basses températures n'est pas intégré dans le modèle à l'heure actuelle.

2.3. Conclusion sur l'utilisation du modèle pour l'étude par simulation

L'utilisation du lot A-06 pour l'évaluation des prévisions du modèle a pu engendrer des écarts plus importants entre observations et simulations que si les lots M-05 ou M-06 avaient été utilisés. Cependant, les tendances générales pour les cinétiques et les taux finaux de germination et de levée sont assez bien reproduits par le modèle, même si des écarts sont constatés. L'analyse menée permet d'aborder le programme de simulations avec les conclusions suivantes :

- **les cinétiques et taux de germination sont relativement bien prévus.** Ce résultat correspond à ce qui a été constaté lors du test du modèle sur différentes espèces (Dürr *et al.*, 2001 ; Dorsainvil *et al.*, 2005 ; Moreau-Valancogne *et al.*, 2008) ;
- **les taux finaux de levées sont aussi assez bien prévus.** Par contre, **les cinétiques simulées sont en avance par rapport aux observations.** Les écarts peuvent être en partie attribués aux difficultés d'estimation du paramètre T_{ball} dans le cas du lot étudié. On peut attribuer aussi une partie de ces écarts à une compacité accrue du lit de semence sous l'effet des pluies dans le type de sol de l'essai. Une telle sous-estimation du temps mis pour lever a déjà été observée dans le même type de sol (Moreau-Valancogne *et al.*, 2008), alors qu'elle était beaucoup plus limitée dans le cas des autres tests du modèle dans des sols moins sensibles à la reprise en masse ;
- **les différentes causes de non-levées sont pour la plupart bien restituées.** L'analyse des causes de non-levées indique que la principale cause de non levée dans ces conditions de semis a été

un blocage sous croûte. Les taux de plantules bloquées sous croûtes paraissent bien restitués par le modèle.

Le génotype Paraggio a un taux de plantules bloquées sous croûte observé légèrement plus faible, ce qui est restitué dans les simulations *via* sa distribution de forces d'émergence. L'écart induit par cette différence de force est relativement faible, de l'ordre de 10%. On peut supposer que la résistance des croûtes formées est très supérieure à la force exercée par les plantules et limite les différences possibles. Ce point, évaluant l'effet de différences de forces exercées par des génotypes, n'avait jamais été testé précédemment sur d'autres espèces. Les mortalités sous mottes sont restées faibles étant donné la structure du lit de semences dans l'essai. Les taux prévus sont bien estimés. De la même manière, les taux de non-germination observés sont restés très faibles. Ces taux de non-germination ne sont pas dus à des stress hydrique et thermiques au cours de la germination. Ils correspondent aux taux de semences non-germées résiduels, propres aux lots de semences utilisées. Ces taux sont estimés pour la simulation à partir des observations sur papier buvard en laboratoire. On constate qu'ils sont légèrement sur-estimés. Dans le cas de *M.tr.*, l'estimation de ce taux est rendue délicate par la dormance tégumentaire. Enfin, sur le terrain, des plantules anormales ont été observées. Ce type de plantules, déjà observé pour d'autres espèces, est une cause de mortalité assez importante, apparaissant lors de semis en conditions de températures basses pour l'espèce. Cela n'est pas intégré à l'heure actuelle dans les prévisions du modèle car difficile à modéliser. Il s'agit d'une limite pour la qualité des prévisions en conditions froides.

En résumé, le formalisme du modèle et le paramétrage donné aux différents génotypes permettent de restituer une large partie des comportements observés et les différences entre génotypes. L'analyse de l'origine des écarts observés ne remet pas en cause la représentation des processus telle qu'elle est intégrée dans le modèle, hormis la représentation des effets des basses températures sur les taux de plantules anormales. Dans la perspective du programme d'étude par simulation, le modèle peut être utilisé en tenant compte de l'analyse et des conclusions qui viennent d'être dressées.

3. Etude par simulation des effets de la diversité génétique sur la levée

3.1. Démarche et conditions des simulations

Les différentes étapes de l'étude menée par simulation ont visé :

- à établir dans une plus **large gamme de conditions de milieu** les différences de levée susceptibles de se produire, en relation avec les différences de valeur de paramètres des génotypes étudiés au Chapitre I ;

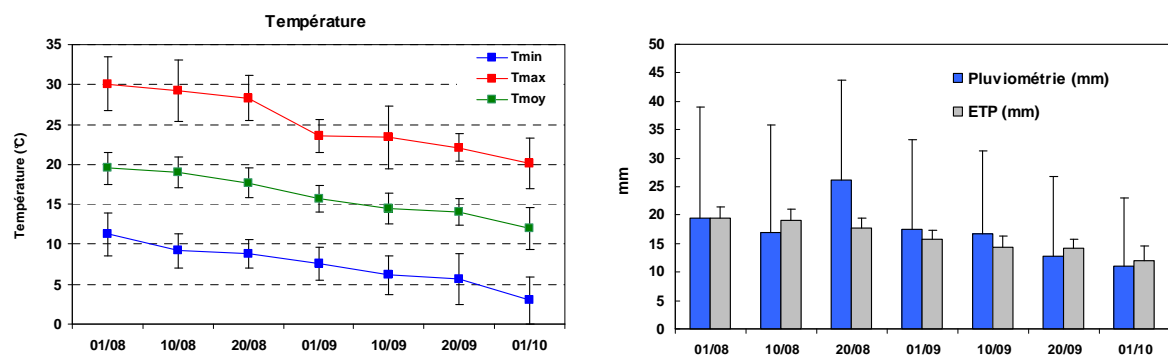


Figure 2.11 : Conditions météorologiques par décade sur la période de semis simulée (Août-Octobre 1994-2002, St Quentin. 02, MétéoFrance). La date donnée correspond à celle du début de la décade. Les écart-types représentent la variabilité entre les 8 années.

Nombre de mottes par classe de taille	5-10 mm	10-20 mm	20-30 mm	30-40 mm	40-50 mm
Fin	333	51	1	-	-
Grossier	330	40	30	4	1

Tableau 2.5 : Caractéristiques des deux lits de semences simulés.

- identifier les conditions de milieu aboutissant aux plus grandes variations de levée et aux plus grandes différences de résultats entre génotypes ;
- **extrémiser les différences dans cette même gamme de conditions de milieu en créant deux génotypes virtuels** aux comportements encore plus contrastés regroupant un ensemble de paramètres favorables ou défavorables à la levée;
- **identifier les paramètres à l'origine des plus larges variations de résultats de levée.** Pour cela, nous avons fait varier les paramètres l'un après l'autre à partir de l'idéotype qui rassemble les paramètres favorables à la réussite des levées, en choisissant des conditions environnementales susceptibles de créer de grandes difficultés de levée. Cette partie de l'étude peut être considérée comme une analyse de sensibilité à la valeur prise par les différents paramètres, mais guidée en donnant comme ampleur de variation au paramètre modifié, l'ampleur obtenue pour ce paramètre lors de l'analyse de la diversité génétique, et non une ampleur du type $\pm x\%$ de la valeur de ce paramètre.

La construction de tels génotypes virtuels et la recherche des paramètres les plus impliqués permettent d'amplifier des différences génotypiques, de simuler les résultats de génotypes ayant des caractéristiques extrêmes susceptibles et d'évaluer à l'aide du modèle l'ampleur des modifications résultantes pour la germination et la levée.

3.1.1. Conditions générales de semis et de simulation

Les conditions du programme d'étude ont été choisies de la manière suivante. Nous avons utilisé un jeu de données climatiques disponible obtenu dans le cas d'un sol limono-argileux (0.17g.g^{-1} argile, température et teneur en eau ; Carrera et Dürr, 2003) sous un climat de type tempéré sur la période 1994-2002, ce qui permet une première étude des effets de la variabilité naturelle d'un climat. Nous avons retenu de couvrir une période correspondant à un semis de fin d'été, début d'automne. Cela a abouti à simuler 7 dates de semis, réparties par décade du 1^{er} Août au 1^{er} Octobre sur les 8 années climatiques étudiées (Figure 2.11).

Nous avons défini comme conditions de semis un lit de semences fin très peu motteux tel que celui rencontré lors de l'expérimentation au champ et nous avons aussi simulé l'effet d'un lit de semence plus grossier (Tableau 2.5). Ce dernier correspond à un lit de semences tel que ceux observés dans le cas d'un semis d'une graine de la taille de *M. tr.* (par exemple betterave, colza ou blé, Boizard *et al.*, 2002). La distribution des profondeurs de semis utilisée correspond à une profondeur moyenne de l'ordre de 15 à 20 millimètres.

IDEOTYPE			MtrFirst	MtrLast
GERMINATION				
Température de base Tb_{germ}		°C	1.9	3
Pourcentages de germination	0-7 °Cj		3	0
par classes de somme de temps	7-9 °Cj		25	4
thermiques (STT, calculée en	9-11 °Cj		33	13
utilisant la Tb_{germ})	11-13 °Cj		22	21
	13-15 °Cj		10	21
	15-17 °Cj		4	16
	17-19 °Cj		2	10
	19-21 °Cj		1	6
	21-23 °Cj		0	3
	23-25 °Cj		0	2
	>25 °Cj		0	2
Pourcentage de non germées		%	0	2
Potentiel hydrique de base Ψb_{germ}		MPa	-1.32	-0.57
CROISSANCE HETEROTROPHE				
Température de base d'allongement $Tball$		°C	5.4	7.4
Paramètres de la fonction	a	mm	72.4	62.7
d'élongation	b	°Cj ⁻¹	0.032	0.023
	c		1.592	2.003
OBSTACLES MECANIQUES				
Paramètres de la fonction de probabilité de mortalité sous mottes	Mottes enfouies			
	α	mm ⁻¹	0.0251	0.0360
	L_0	mm	15	10
	Mottes posées			
Coefficient de franchissement d'une croûte	α	mm ⁻¹	0.0219	0.0258
	L_0	mm	29.15	26
	p	%	50	40

Tableau 2.6 : Valeurs des paramètres données aux idéotypes MtrFirst et MtrLast construits à partir des géotypes étudiés.

3.1.2. Caractéristiques des génotypes et des idéotypes créés

Les effets de différentes conditions de semis ont d'abord été simulés pour les différents génotypes observés lors de l'essai au champ pour le test du modèle. Les valeurs des paramètres données à ces génotypes sont celles déterminées pour le lot A-06, seul lot pour lequel on dispose, pour quatre des génotypes, des valeurs pour l'ensemble des paramètres (Tableau 2.1). Nous avons ajouté à ces quatre génotypes, retenus pour leurs caractéristiques contrastées, un cinquième génotype DZA045.5. Celui-ci se distingue par son potentiel hydrique de base pour la germination significativement plus faible. Nous avons affecté à ce génotype les valeurs observées dans le cas de A17 pour les paramètres concernant la mortalité sous obstacle, qui n'avaient pas été établis pour DZA045.5.

Nous avons réalisé les simulations en utilisant le programme WinSIMPLE (2003). Il s'agit de la version du logiciel qui dispose d'une interface utilisable en routine pour réaliser un très grand nombre de simulations. Cette version fonctionne cependant avec un module prévoyant le franchissement des croûtes qui n'intègre pas directement les distributions de force d'émergence. Ce franchissement est prévu *via* un coefficient de passage qui dépend de cette force. Les variations de ce coefficient pour les différents génotypes ont été estimées en utilisant la version 2006, utilisée pour le test des prévisions du modèle, qui intègre la distribution des forces comme paramètre d'entrée, mais qui est uniquement disponible sous Matlab et non interfacée. L'ampleur des différences sur la levée pour ce coefficient est de 10% (Tableau 2.1, coefficient p ; Figure 2.10). Puis nous avons réalisé le programme d'étude par simulations en utilisant les coefficients ainsi estimés pour les génotypes.

Nous avons aussi cherché à simuler les levées dans les mêmes gammes de conditions pour des génotypes virtuels. Pour créer ces génotypes virtuels, nous avons rassemblé un ensemble de valeurs des paramètres selon deux principes :

- dans le cas de l'idéotype dénommé MtrFirst (MF), nous avons rassemblé toutes les valeurs de paramètres favorisant un déroulement rapide avec un taux de réussite élevé de toutes les étapes la germination et la levée ;
- à l'opposé, dans le cas du génotype virtuel dénommé MtrLast (ML), des valeurs de paramètres étant *a priori* défavorables à toutes les étapes jusqu'à la levée.

Nous avons rassemblé les valeurs des paramètres provenant des résultats obtenus pour les lots M-05 et M-06 (Tableau 2.6). En effet, nous avons considéré qu'ils représentaient mieux la gamme de valeurs possibles que le cas plus particulier du lot A06 (cf. Chapitre I). En l'absence d'autres références, nous avons cependant conservé les paramètres de mortalité sous mottes et croûtes obtenus expérimentalement pour le lot A-06.

Nous avons enfin cherché à identifier les caractéristiques des plantes qui influencent le plus fortement la réussite des levées selon les conditions environnementales rencontrées au cours de la germination et de la levée. Pour cela, nous avons fait varier les paramètres de la manière suivante. Les différentes valeurs de paramètre de l'idéotype MtrFirst (rassemblant les valeurs de paramètres les plus favorables à la levée) ont été modifiées l'une après l'autre, en affectant la valeur plus défavorable donnée à MtrLast pour le paramètre considéré (Tableau 2.7). L'objectif est de hiérarchiser les paramètres compte-tenu de leur effet propre sur les variations de la levée et de mieux préciser l'origine de cet effet sur les levées. Nous avons choisi dans le jeu de données climatiques disponibles des dates de semis et années pour lesquelles les conditions météorologiques pouvaient exacerber la différence de valeurs du paramètre considéré afin d'évaluer l'ampleur des différences susceptibles d'être observées.

3.1.3. Variables de sortie analysées et calculs statistiques

Les variables de sortie du modèle analysées ont été les suivantes :

- le taux final de levées et le temps mis pour atteindre 30% de levées (taux généralement atteints) ;
- le temps mis pour obtenir 80% de germination ;
- les causes de non-levées obtenues. Les différentes causes possibles simulées sont la non germination, des longueurs de trajets trop importantes pour atteindre la surface, des pertes par blocage sous des obstacles mécaniques, mottes et croûte formée à la surface.

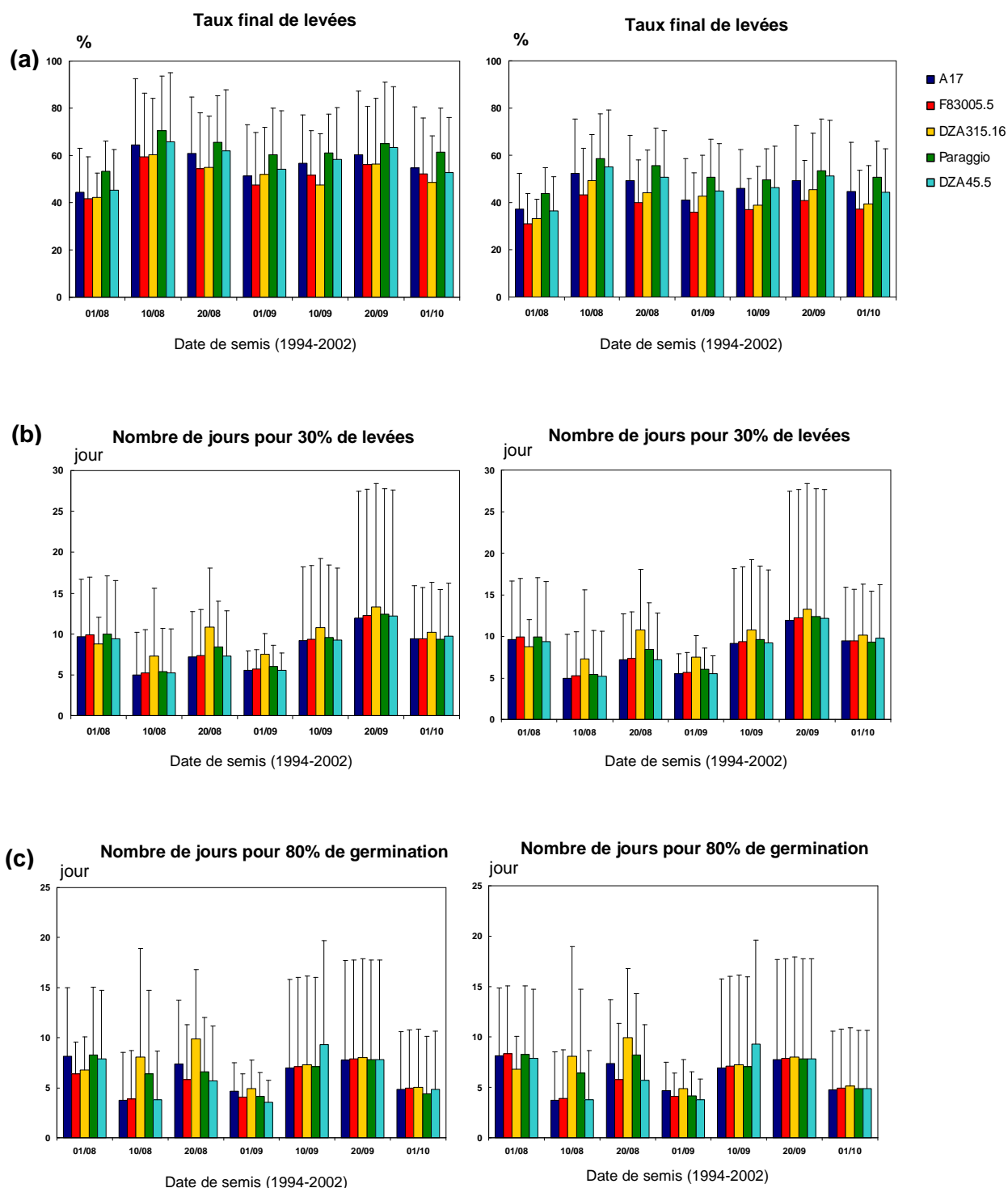
Les résultats sont présentés sous forme de graphiques récapitulant pour les différentes dates de semis, les valeurs moyennes et les écarts-types des variables analysées, pour les 8 années simulées. L'analyse des résultats a amené à s'intéresser aux résultats obtenus certaines années à certaines dates particulières. Ces résultats sont alors précisés dans le texte.

Pour comparer les résultats des simulations de génotypes virtuels, la simulation de chaque situation (génotype x date de semis x année x lit de semences) a été répétée 3 fois afin d'obtenir la moyenne et l'écart-type du résultat et procéder à tests de comparaison de moyenne entre situations simulées.

Au total le programme d'étude a permis de réaliser 800 simulations, correspondant à l'équivalent expérimental de 800 situations de semis.

A- Lit de semences fin

B- Lit de semences grossier



Figures 2.12 (a), (b) et (c) : Résultats des simulations aux 7 dates de semis sur les années 1994 à 2002, pour les 5 génotypes; (a) taux finaux de levée ; (b) Nombre de jours pour atteindre 30% de levées ; (c) temps pour atteindre 80% de germination. La barre représente l'écart-type des simulations sur les 8 années (1994-2002).

3.2. Résultats des simulations dans une large gamme de conditions de semis pour les génotypes caractérisés au laboratoire

On obtient une forte variation globale des taux de levées finaux : entre 40 et 70% selon les dates de semis, les années et les génotypes pour le lit de semences fin ; entre 30 et 60% pour le lit de semences grossier (Figure 2.12 a).

Les deux génotypes Paraggio et A17 ont des taux en moyenne supérieurs à ceux des autres génotypes étudiés, de l'ordre de 5 à 10% pour les deux lits de semences. Le génotype DZA045.5 présente des valeurs plutôt élevées mais restant de l'ordre de celles de Paraggio et de A17. Les génotypes DZA315.16 et F83005.5 présentent les taux de levée les plus faibles. Ces taux sont assez voisins bien que ces deux génotypes se distinguent sur des paramètres différents (Tableau 2.1).

Le taux de levée le plus élevé enregistré est de 99% pour Paraggio. Dans les mêmes conditions (semis du 20/09/2000), le génotype F83005.5 présente le taux le plus faible : 90%, ce qui reste néanmoins très élevé. Cette différence s'explique par le taux de non-germées résiduel élevé de F83005.5 (Tableau 2.1). Le plus faible taux de levée, enregistré en 2002 dont l'automne a été très sec, est de 20% pour DZA315.16. Dans les mêmes conditions, le génotype DZA45.5 présente le taux le plus élevé, 60%. Les conditions de levée favorables amenuisent les différences entre génotypes. Les conditions les plus défavorables apparaissent lors de stress hydrique dans le lit de semences, qui exacerbent alors les différences entre génotypes liées au paramètre concerné par ce type de stress. Le modèle permet de chiffrer l'ampleur des différences de taux selon les conditions de milieu et d'identifier les conditions aboutissant aux plus fortes amplitudes.

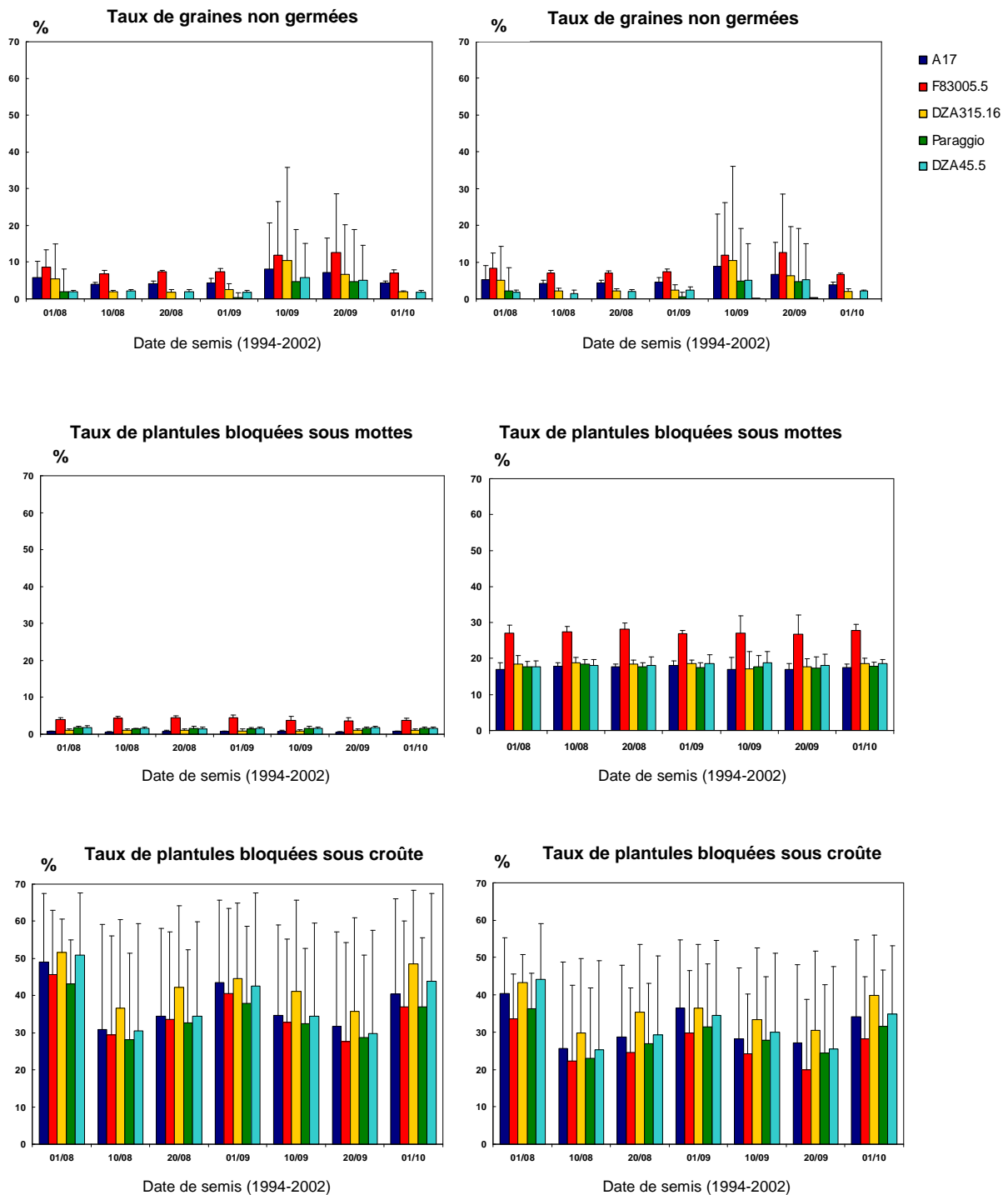
Lorsque l'on considère le temps nécessaire pour atteindre 30 % de levées (Figure 2.12 b), il varie de façon très importante : de 5 à 13 jours selon les dates de semis pour le lit de semences fin, il est encore accru de 1 à 2 jours en moyenne dans le cas du lit de semences grossier. Le temps pour obtenir 80% de germination varie pour sa part entre 3 à 10 jours (Figures 2.12 c) pour les deux lits de semences. Le temps requis pour franchir l'étape de germination intervient déjà de façon importante dans la variabilité observée pour le temps mis pour lever.

La variabilité inter-annuelle, et entre dates de semis, des temps mis pour lever est très forte. Un délai moyen plus long et une plus forte variabilité inter-annuelle apparaît pour les deux dernières décades de septembre. A ces dates là, le délai pour atteindre 30% de levées dépasse 25 jours certaines années. Ces années (1996, 1997, 2002) sont des années sèches, à pluviométrie nulle pendant ces décades. Le génotype DZA315.16 se distingue par un temps pour atteindre 30% de levées plus élevé de 2 à 3 jours pour la plupart des dates de semis.

A- Lit de semences fin

B- Lit de semences grossier

(d)



Figures 2.12 (d) : Résultats des simulations aux 7 dates de semis sur les années 1994 à 2002, pour les 5 génotypes; (d) causes de non levées (non germées, plantules bloquées sous mottes, plantules bloquées sous croûte). La barre représente l'écart-type des simulations sur les 8 années (1994-2002).

Le modèle fournit les pourcentages des différentes causes de non-levées, ce qui permet d'analyser l'origine des différences des taux de levées selon les dates et conditions de semis, les années et les génotypes. Les différences de taux de levées entre génotypes résultent du cumul de plusieurs causes (Figures 2.12 d).

La part due aux obstacles de surface (formation d'une croûte) est très nettement la plus importante. Les taux de bloquées sous croûte varient en moyenne de 20 à 50% selon les dates de semis et les génotypes. Ces taux présentent quelle que soit la date de semis simulée une très forte variabilité inter-annuelle. Le génotype Paraggio dont le coefficient de franchissement des croûtes p est le plus élevé (Tableau 2.1), présente systématiquement le taux de bloquées sous croûte le plus faible quelque soit la date de semis. Cette différence reste limitée à environ 10%. A l'opposé, DZA315.16 est le génotype qui présente les plus forts taux de plantules bloquées sous croûte. Les paramètres qui différencient ce génotype ne portent cependant pas sur le franchissement des croûtes : il diffère par des paramètres qui ralentissent ses cinétiques de germination et d'allongement (Tableau 2.1).

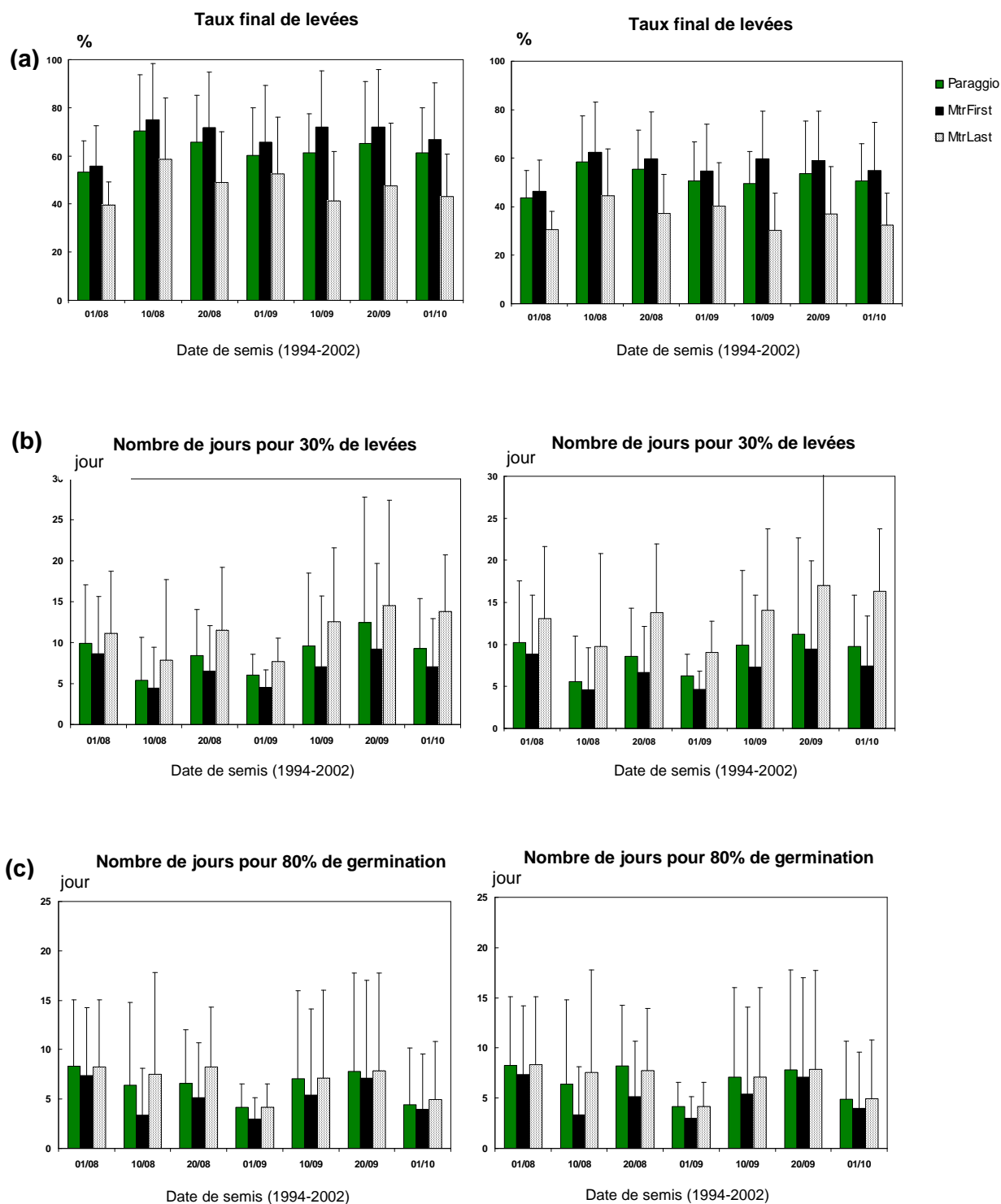
Enfin, le taux de plantes bloquées sous croûte dépend du nombre de plantes qui parvient à atteindre la surface. Celui-ci peut déjà avoir été limité par les autres causes de mortalité intervenues avant l'arrivée à la surface. Cela implique que le taux de mortalité sous croûte peut être plus élevé pour des génotypes ayant eu peu de pertes avant l'étape de franchissement à la surface. C'est le cas de A17 et DZA045.5, qui présentent peu de non germées, comparés aux autres génotypes, pour les dates de semis de septembre.

L'importance de l'effet d'une croûte sur la levée montrée par ces simulations est cohérente avec les observations réalisées lors de l'expérimentation de terrain (SNES 2007). Le travail de simulation permet de généraliser l'importance de cette cause de perturbations des levées, et les différences observées entre génotypes (cf. Chapitre II.2).

Les obstacles du type mottes sont ensuite les plus importantes sources de mortalité dans le cas du lit de semences grossier, causant alors une mortalité moyenne de l'ordre de 20% des plantes. Le génotype F83005.5 est le plus affecté par ces conditions, ce qui est cohérent avec la différence de valeur des paramètres concernés (α et L_0), pour ce génotype. Les simulations permettent de chiffrer la surmortalité moyenne, de l'ordre de 10% des plantules, ce qui est observé dans le cas d'un lit de semences motteux. Ces valeurs ne varient que très peu entre dates de semis ou entre année, car les effets de la structure initiale du lit de semences sur la mortalité sous mottes sont indépendants des conditions climatiques dans les simulations réalisées. La variabilité observée entre simulations est uniquement due à la variabilité issue des différents tirages au sort dans les différentes distributions réalisées pour mettre en œuvre les simulations.

A- Lit de semences fin

B- Lit de semences grossier



Figures 2.13 (a), (b) et (c) : Résultats des simulations aux 7 dates de semis sur les années 1994 à 2002, pour les 2 idéotypes MtrLast et MtrFirst et le cultivar Paraggio rappelé en référence; (a) taux finaux de levée ; (b) Nombre de jours pour atteindre 30% de levées ; (c) temps pour atteindre 80% de germination. La barre représente l'écart-type des simulations sur les 8 années (1994-2002).

L'absence de germination est une cause qui provoque une perte de levée moyenne assez faible, entre 0 et 10%. Ce taux moyen est cependant très variable selon la date de semis, plus élevé pour les dates de semis des deux dernières décades de septembre. Les taux obtenus pour ces deux décades présentent en outre une très forte variabilité inter-annuelle.

Le taux le plus élevé obtenu en moyenne quelque soit la décade, est celui du génotype F83005.5. Ce génotype a le taux de non-germées, propre au lot et indépendant des circonstances, le plus élevé (Tableau 2.1). Si les différences entre génotypes restent limitées à quelques pourcents en moyenne, elles peuvent s'exacerber selon les dates de semis. Le génotype DZA045.5 présente toujours les plus faibles taux de non germés, en particulier pour les semis des décades très sèches de septembre 2002 (30%). Ce génotype a la plus faible valeur de potentiel hydrique de base pour la germination. Les plus forts taux de non-germination sont obtenus pour ces conditions très sèches en septembre 2002 : ce taux atteint 78% pour le génotype DZA315.16 qui est le plus affecté.

Enfin, on doit souligner qu'aucune perte n'est liée à une longueur de trajet trop importante pour atteindre la surface quelque soit la simulation (non montré). Les longueurs d'hypocotyle sont dans tous les cas, pour tous les génotypes, largement supérieures aux profondeurs de semis et au trajet à parcourir par les plantules pour émerger, y compris dans le lit de semences grossier.

Ces résultats concernant les effets d'un lit de semences grossier ou les effets de périodes de semis très sèches, permettent de chiffrer les différences entre génotypes dans de telles conditions. Ce type de conditions n'avait pas été observé sur le terrain lors du semis de l'essai. Les simulations permettent donc d'évaluer les différences entre génotypes dans des conditions qui n'avaient pas été obtenues lors de l'expérimentation sur le terrain.

3.3. Simulation des levées des génotypes virtuels extrêmes

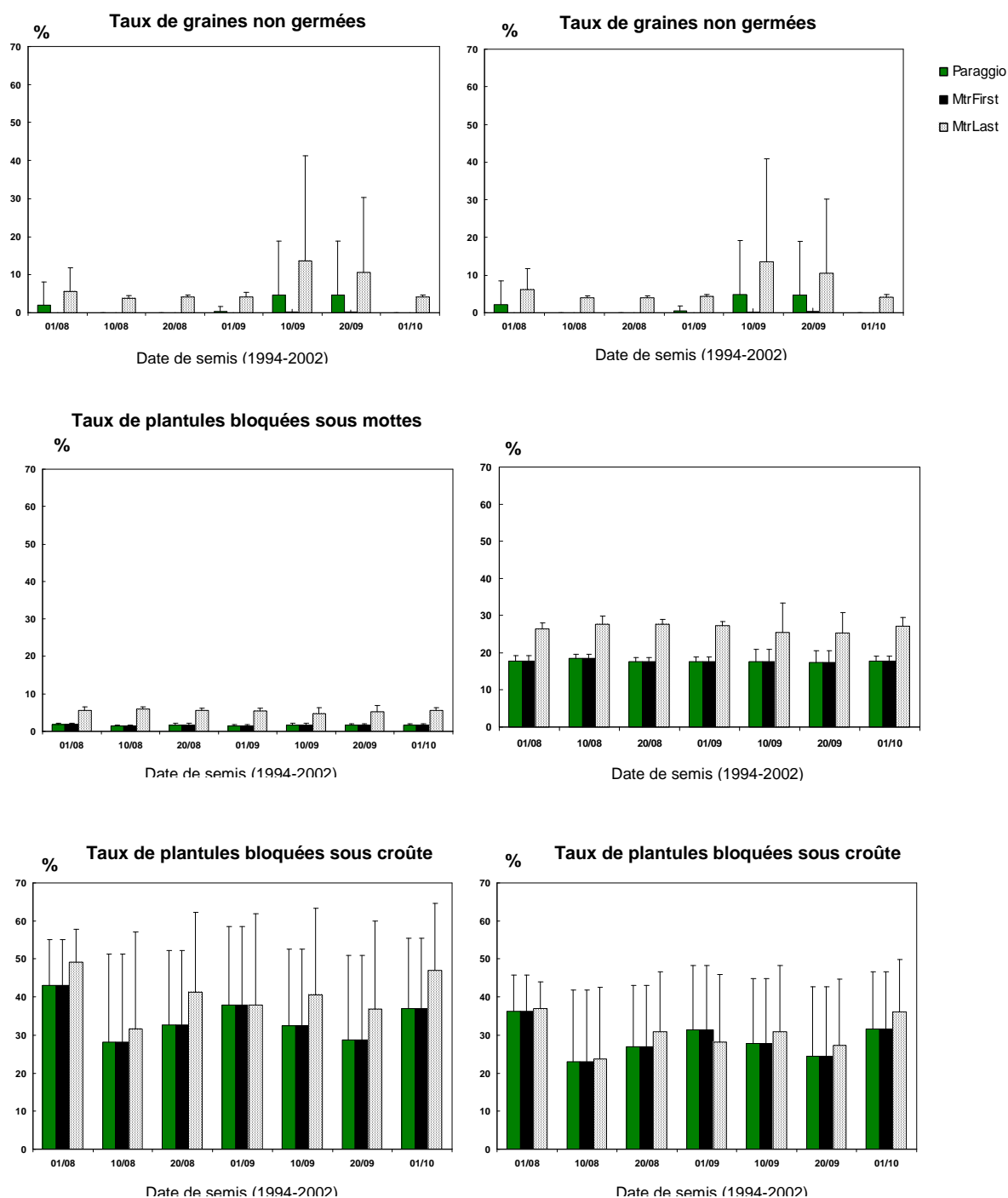
Les résultats concernant les génotypes virtuels que nous avons constitués permettent d'évaluer des différences extrêmes de valeurs de paramètres, rassemblées pour un même génotype (Figures 2.13). De plus, les valeurs données aux paramètres proviennent des mesures sur les lots M-05 et M-06, valeurs de référence plus caractéristiques pour ces génotypes. Les résultats obtenus pour le génotype Paraggio ont été rappelés sur les figures présentant ces résultats, à titre de comparaison avec un cultivar enregistré dans le catalogue officiel des cultivars australiens (www.pi.csiro.au/ahpc/).

L'idéotype MtrFirst présente le taux de levées le plus élevé quelle que soit la date de semis et MtrLast le plus faible : l'ampleur moyenne de la différence est de 15-20% (Figure 2.13 a). C'est pour la date du 10/09 que l'écart moyen entre les deux idéotypes est le plus important (30%).

A- Lit de semences fin

B- Lit de semences grossier

(d)



Figures 2.13 (d): Résultats des simulations aux 7 dates de semis sur les années 1994 à 2002, pour les 2 idéotypes MtrLast et MtrFirst et le cultivar Paraggio rappelé en référence; (d) causes de non levées (non germées, plantules bloquées sous mottes, plantules bloquées sous croûte). La barre représente l'écart-type des simulations sur les 8 années (1994-2002).

Cela correspond à plusieurs années pour lesquelles, à cette date de semis, l'écart des taux de levée a été maximum. Ces années (1994, 1996 et 2002) correspondent à des circonstances climatiques particulières :

- faible pluviométrie et donc stress hydrique au semis (1996, 2002) conduisant à un taux de non germées très élevé pour MtrLast (85% environ contre 5%), ce qui altère le taux de levée final ;
- ou basses températures combinées à une forte pluviométrie (1994) aboutissant à 50% de plantes bloquées sous croûtes pour MtrLast contre 5% pour MtrFirst.

MtrFirst lève toujours plus rapidement que MtrLast : la différence entre les temps mis pour atteindre 30% de levées est comprise en moyenne entre 3 et 7 jours selon les dates de semis (Figure 2.13 b). Les écarts les plus importants peuvent atteindre 16 jours, comme cela est observé lors des deux dernières décades de 1998 qui sont caractérisées par une pluviométrie très faible et des températures froides.

Lorsque l'on considère les différentes causes de non-levée (Figures 2.13 d), MtrFirst présente toujours les valeurs les plus faibles quelque soit la cause considérée, alors que MtrLast conjugue toutes les valeurs les plus élevées sauf pour les bloquées sous croûtes, en raison d'un taux de non germées très important (qui limite donc le nombre de plantules qui arrivent à la surface).

Ces résultats permettent de chiffrer l'amplitude maximum des différences de levées à attendre des différences génotypiques mises en évidence et de comparer les valeurs obtenues pour ces génotypes virtuels à un génotype cultivé (Paraggio). Les écarts moyens restent relativement limités : les simulations mettent en évidence les conditions climatiques difficiles qui exacerbent les différences de levée entre génotype.

3.4. Simulation des effets des différents paramètres

3.4.1. Choix des conditions de simulation

Nous avons étudié le comportement de nouveaux idéotypes construits en modifiant les paramètres un à un, en affectant à MtrFirst (MF) la valeur de MtrLast (ML) pour les différents paramètres considéré successivement (Tableau 2.7) :

- tout d'abord, les paramètres concernant les effets de la température sur la germination ont été modifiés : la température de base (Tbgerm, idéotype MF_Tbgerm), la vitesse de germination au travers de la distribution des sommes de temps thermiques pour germer, STT (MF_STT), puis les deux simultanément (MF_Tbgerm-STT) ;
- puis, le potentiel hydrique de base de germination (Ψ bgerm) a été modifié (MF_ Ψ bgerm) ;
- enfin, ce sont les paramètres concernant l'étape suivant la germination dont les effets ont été analysés : les paramètres de la fonction d'allongement (a, belon et celon ; MF_abc) et la température

IDEOTYPE		MtrFirst	MF_Tbgerm	MF_STT	MF_Ψbgerm	MF_abc	MF_Tbal
GERMINATION							
Température de base	°C	1.9	3				
<i>Tbgerm</i>							
Pourcentages de	0-7 °Cj	3		0			
germination par classes de	7-9 °Cj	25		4			
somme de temps	9-11 °Cj	33		13			
thermiques (STT, calculée	11-13 °Cj	22		21			
en utilisant la <i>Tbgerm</i>)	13-15 °Cj	10		21			
	15-17 °Cj	4		16			
	17-19 °Cj	2		10			
	19-21 °Cj	1		6			
	21-23 °Cj	0		3			
	23-25 °Cj	0		2			
	>25 °Cj	0		2			
Pourcentage de non	%	0		2			
germées							
Potentiel hydrique de base	MPa	-1.32		-0.57			
<i>Ψbgerm</i>							
CROISSANCE HETEROTROPHE							
Température de base	°C	5.4					7.4
d'allongement Tball							
Paramètres de la fonction	<i>a</i> mm	72.4				62.7	
d'élargation	<i>b</i> °Cj ⁻¹	0.032				0.023	
	<i>c</i>	1.592				2.003	

Tableau 2.7 : Valeurs des paramètres données aux idéotypes construits pour mesurer l'effet des différents paramètres. Les valeurs par défaut sont celles de MtrFirst et la valeur modifiée (spécifiée dans la colonne décrivant l'idéotype) est celle de MtrLast.

Les idéotypes MF_Tbgerm-STT et MF_abc-Tbal combinent les caractéristiques de MF_Tbgerm et MF_STT, et MF_abc et MF_Tbal, respectivement.

Pour les idéotypes dont on a fait varier les paramètres relatifs à l'allongement, les deux coefficients de franchissement d'une croûte ont été testées ($p=50\%$ et $p=40\%$).

Semis	jour	1 ^{ère} décade									2 ^{ème} décade										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
01/10/1998	Pluvio	0	0	0.6	0.4	0.2	0	1	10	9.6	1.8	4.6	0	0.8	3	0	0.4	1.6	0	0	0.4
	Temp	13.5	9.6	6.9	6.3	8.1	7.6	8.9	9.3	7.6	11.3	11.1	11.7	9.9	13.8	12.9	11.8	13.3	9.5	7.5	7.6
10/09/2002	Pluvio	0.2	0.2	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	2.8	0	0	0.8	1.8	0	0.2	0
	Temp	14.9	14	16.8	15.8	15.3	16.9	14.2	13.9	14.6	13.7	14.7	14.5	12.7	12.9	10.6	9.7	12.6	12.2	13.7	11.6
10/08/1996	Pluvio	6.4	7.8	9	13.8	0	0	0.2	0	0	0	10.2	0	0	0.4	10	2	0	33.2	1.2	29.2
	Temp	18.6	17.6	15.7	15.2	19.4	19.2	16.5	19	19.8	20.9	21.4	19.5	17.7	18.4	15.5	16	15.5	15.2	14.7	12.4

Tableau 2.8 : Données de pluviométrie (Pluvio, mm) et de température (Temp, °C) des deux premières décades suivant les dates de semis retenues pour analyser les effets respectifs des différents paramètres.

de base d'allongement (Tball ; MF_Tbal) ; les deux simultanément (MF_abc-Tbal) ; puis le coefficient de franchissement des croûtes (p ; MF_abcp40 ; MF_Tbalp40 ; MF_abc-Tbalp40).

Nous n'avons pas fait varier les coefficients relatifs aux taux de plantes bloquées sous mottes car l'effet de ces paramètres est indépendant des valeurs des autres paramètres et des conditions climatiques. Leur effet a déjà été évalué par l'analyse précédente réalisée sur les idéotypes MF et ML.

Du point de vue des conditions climatiques, nous avons choisi des décades particulières, repérées lors de l'analyse menée au paragraphe précédent et permettant d'exacerber les modifications des paramètres étudiés (Tableau 2.8) :

- pour obtenir des conditions froides, la décade du 01/10/1998 ;
- pour obtenir des conditions sèches au moment du semis, le 10/09/2002 ;
- et enfin, pour obtenir la formation d'une croûte, le 10/08/1996 (associée à des températures élevées) et le 01/10/1998 (associée à des températures froides).

3.4.2. Résultats des simulations

• *Effet de la modification de la température de base et de la vitesse de germination*

La cinétique de germination est ralentie lorsque température de base et vitesse de germination ont été modifiées (Figure 2.14). Le décalage pour obtenir 80% de germination (t80germ) est de 0.4 jour lorsque Tb_{germ} est modifiée de 1.1°C, soit 30% d'augmentation de la valeur initiale du paramètre. L'augmentation de t80germ est de un jour lorsque la distribution des temps thermiques pour germer est ralentie (temps pour obtenir 80% de germination : 13 vs 22°Cj, soit une augmentation de 50% ; Tableau 2.9). Si les deux paramètres sont modifiés simultanément, le t80germ est augmenté de 1.8 jour. Les différences observées sont significatives mais d'assez faible ampleur malgré les conditions climatiques testées. Les différences de taux final de germination sont très faibles (3%), dues uniquement au taux de non germées résiduel de MtrLast (Tableau 2.9) et non à un effet de la température.

Les cinétiques de levées sont légèrement différentes, décalées au maximum d'un jour pour atteindre 30% de levées (t30lev, différences significatives). Les différences de taux finaux sont significatives tout en restant faibles (7% au maximum). Cet écart résulte des différences de taux finaux de germination mais aussi du ralentissement de la cinétique de germination. Celui-ci retarde l'arrivée des plantules à la surface et augmente le risque qu'elles se retrouvent face à une croûte.

Ces simulations montrent que des modifications assez importantes en valeur relative de ces deux paramètres (30 et 50% des valeurs initiales) n'aboutissent qu'à des modifications assez limitées de la cinétique et du taux de levée finale (1.8 jours et 7% au maximum), même pour une date de semis parmi les plus froides de la gamme de conditions testées. La modification de la vitesse de germination a plus d'effet que le changement de température de base sur la cinétique de germination.

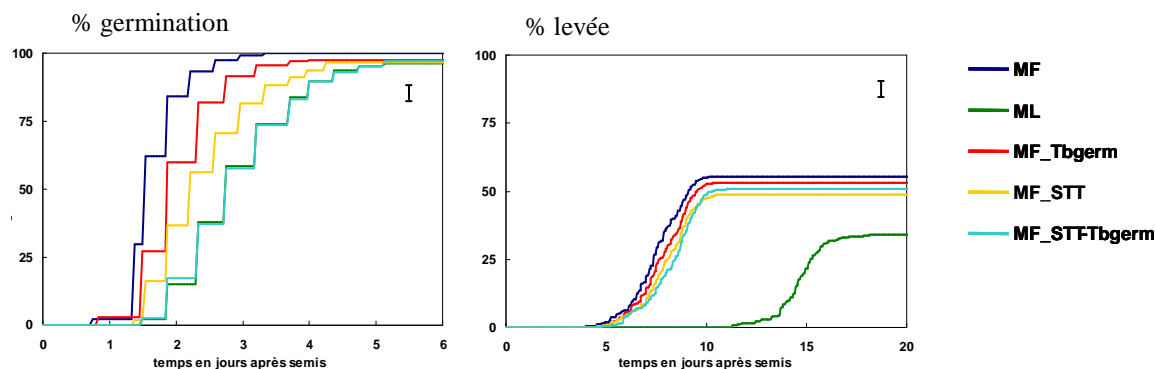


Figure 2.14 : Résultats des simulations pour les différents idéotypes avec modification de la température de base T_{bgerm} et de la vitesse de germination STT .

La barre verticale représente l'écart-type moyen issu de 3 simulations répétées.

	t80 germ (jour)	t30 lev (jour)	Taux final de levée (%)	Non Germées (%)	LgTrajet<Lg Plante (%)	Plantules Bloquées sous mottes (%)	Plantules Bloquées sous croûte (%)
MF	1.9 (0)	7.6 (0.1)	55 (0.6)	0 (0)	0	1.4 (0.1)	44 (0.6)
MF_Tbgerm	2.3 (0)	8.1 (0.1)	52 (1.2)	1.7 (0.6)	0	1.6 (0.4)	45 (1.1)
MF_STT	2.9 (0)	8.4 (0.2)	51 (3)	3.5 (0.8)	0	1.1 (0.4)	44 (2.9)
MF_STT-Tbgerm	3.7 (0)	8.8 (0.1)	50 (1.5)	3.3 (0.3)	0	1.9 (0.2)	45 (1.8)
ML	3.7 (0)	15.8 (0.2)	34 (1.5)	3.2 (0)	0	5.4 (0.4)	57 (2)

Tableau 2.9: Valeurs des variables de sortie du modèle pour les idéotypes dont la température de base et de la vitesse de germination ont été modifiées. Différences significatives sur le taux final de levées et sur le t30lev ($p \leq 0.05$)

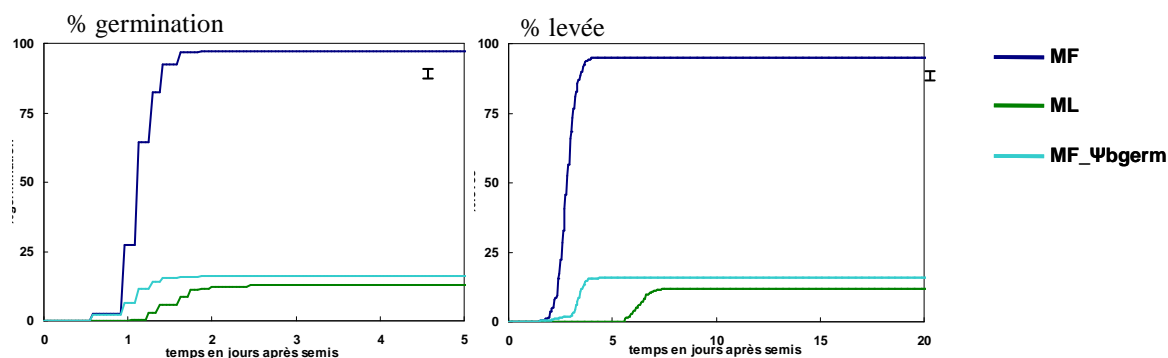


Figure 2.15 : Résultats des simulations pour les différents idéotypes après modification du potentiel hydrique de base.

La barre verticale représente l'écart-type issu de 3 simulations répétées.

	t80 germ (jour)	t30 lev (jour)	Taux final de levée (%)	Non Germées (%)	LgTrajet< Lg Plante (%)	Plantules Bloquées sous mottes (%)	Plantules Bloquées sous croûte (%)
MF	1.3 (0)	2.6 (0)	95.6 (0.5)	2.4 (0.1)	0	1.7 (0.5)	0.3 (0.1)
MF_Ψbgerm	-	-	11.5 (0.4)	87.7 (0.6)	0	0.8 (0.15)	0
ML	-	-	15.6 (1.1)	83.9 (0.8)	0	0.4 (0.2)	0

Tableau 2.10 : Valeurs des variables de sortie du modèle pour l'idéotype dont le potentiel hydrique de base de germination a été modifié.

Différences significatives sur le t80germ, t30lev, taux final de levées et le taux de non germées ($p \leq 0.05$).

Cette modification de cinétique de germination modifie à la fois la cinétique de levée mais aussi influence le taux final, même si la diminution de celui-ci reste limitée.

• *Effet de la modification du potentiel hydrique de base de germination*

La cinétique et le taux final de germination obtenus sont très affectés par la modification du paramètre Ψ_b (-1.32 vs -0.57 MPa, soit 40% de variation) pour la date de semis retenue pour la simulation (conditions très sèches ; Figure 2.15 ; Tableau 2.10). Il en est de même pour la cinétique et le taux final de levée. La germination est terminée après 1.5 jours pour le génotype ayant la valeur seuil la plus faible de potentiel hydrique de base. Pour le génotype qui a la valeur de potentiel hydrique de base la plus élevée, (-0.57 MPa), seules les graines placées le plus profond trouvent une teneur en eau du sol suffisante pour germer. Celles placées en surface ont un environnement trop sec et ne germent pas. Aucune pluie n'intervient pendant 30 jours et les graines placées dans cette zone sèche restent sans pouvoir germer. La non-germination se répercute sur le taux de levée. Etant donné le semis assez superficiel de *M.tr.*, la très grande rapidité de germination de cette espèce et les variations rapides de teneur en eau à l'interface sol-atmosphère, les différences de potentiel hydrique de base ont une forte répercussion, en particulier dans le cas d'une période sans pluie prolongée. Cependant, il suffit d'une pluie de quelques millimètres pour ramener ces premiers centimètres à une teneur en eau permettant la germination, puis l'allongement de la racine permettra l'exploitation d'horizons à la teneur en eau plus élevée et moins variable (voir par exemple Figure 2.6). Les variations de teneurs en eau dans les deux premiers centimètres ont un effet très important sur la cinétique de germination et donc de levée, mais peut-être moins sur le taux final de levée car l'occurrence d'au moins une pluie sur une quinzaine de jours est assez fréquente dans un climat tempéré à l'automne. Les différences de levées entre génotypes seront donc le plus souvent importantes en raison du décalage de cinétique engendré par leur différence de potentiel hydrique de base. Le taux final ne sera altéré que dans des cas extrêmes comme celui simulé.

• *Effet de la modification de la température de base et des paramètres d'allongement et du taux de franchissement des croûtes*

Les simulations réalisées dans des conditions de température élevée (semis S1 du 10/08/1996, température moyenne de la décade 18.2°C) aboutissent à des cinétiques rapides avec des différences qui restent limitées entre simulations : 1.5 jour de différence maximum entre les t_{30lev} pour un même coefficient de franchissement (différence significative ; Figure 2.16 ; Tableau 2.11). Dans ces conditions de température assez élevée, la modification de température de base d'allongement a un effet plus faible que la modification des paramètres de la cinétique d'allongement. Les taux finaux ne présentent pas de différence significative. La diminution de la probabilité de franchissement d'une croûte de 10% affecte sensiblement de la même manière toutes les simulations en réduisant le taux final de levée d'environ 10%.

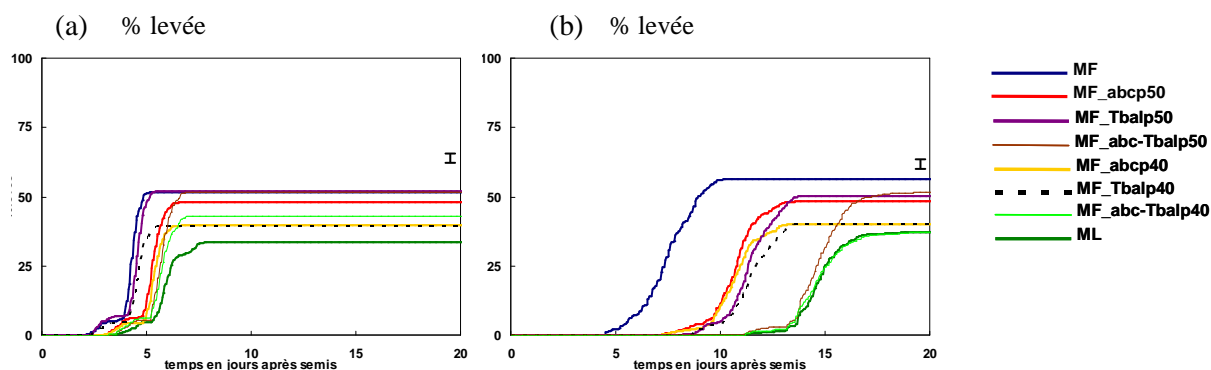


Figure 2.16 : Résultats des simulations pour les différents idéotypes créés avec modification des paramètres, de la vitesse d'allongement a , b et c , $Tball$, et la probabilité p de passage sous croûte ont été modifiées. (a) Semis 10/08/1996 (b) Semis 01/10/1998

La barre verticale représente l'écart-type moyen issu de 3 simulations répétées.

	t30lev (jour)		Non Germées (%)		Plantules Bloquées sous mottes (%)		Plantules Bloquées sous croûte (%)		Taux final de levée (%)	
Simulation	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
MF	4.3 (0.1)	7.5 (0.1)	0	0	1.5 (0.6)	1.2 (0.2)	48 (2.2)	42 (1.1)	51 (2)	57 (1)
MF_acbp50	5.4 (0)	10.9 (0.1)	0	0	1.7 (0.6)	1.7 (0.4)	49 (1.3)	49 (0.8)	50 (1.5)	49 (1.1)
MF_Tbalp50	4.6 (0.1)	11.5 (0.1)	0	0	1.7 (0.1)	1.4 (0.2)	48 (1.1)	48 (2.3)	51 (1)	51 (2.1)
MF_abc-Tbalp50	5.8 (0)	15 (0)	0	0	1.7 (0.3)	1.6 (0.4)	49 (2.4)	49 (1.8)	49 (2.3)	49 (2.1)
MF_acbp40	5.5 (0.1)	11.3 (0.1)	0	0	1.8 (0.6)	1.4 (0.5)	58 (0.8)	59 (0.1)	41 (0.8)	40 (0.6)
MF_Tbalp40	4.7 (0.1)	12.2 (0.1)	0	0	2 (0.4)	1.2 (0.1)	58 (0.9)	59 (0.2)	40 (0.6)	40 (0.2)
MF_abc-Tbalp40	5.9 (0)	15.6 (0.1)	0	0	1.7 (0.05)	1.6 (0.1)	56 (1.2)	60 (1.4)	42 (1.2)	39 (1.3)
ML	6.7 (0.3)	15.8 (0.3)	4.1 (0.6)	4.7 (1.9)	5.1 (0.6)	5.5 (0.8)	56 (1.7)	54 (1.4)	35 (1.4)	36 (1.4)

Tableau 2.11 : Valeurs des variables de sortie du modèle pour les idéotypes dont la température de base d'allongement, de la vitesse d'allongement et la probabilité de passage sous croûte ont été modifiées. S1 : Semis 10/08/1996 ; S2 : Semis 01/10/1998.

Les valeurs entre parenthèses sont les écart-types.

Pour le semis du 10/08/1996 et du 01/10/1998, les différences sont significatives sur t30lev entre ML, MF_abc-Tbalp50, MF_abc-Tbalp40, MF_acbp50, MF_acbp40 ($p \leq 0.003$).

Les simulations réalisées dans des conditions de température plus froide (semis S2 du 01/10/1998, moyenne de la décade 8.7°C) indiquent un temps mis pour lever beaucoup plus long et des écarts accrus entre cinétiques (Figure 2.16 ; Tableau 2.11): 3.4 jours supplémentaires pour atteindre t_{30lev} lorsque les paramètres de la cinétique d'allongement est modifiée ; 4 jours lorsque T_{ball} est augmentée de 2°Cj. Le cumul d'un changement de température de base et des paramètres de la fonction d'allongement aboutit à un écart extrême entre les cinétiques de levée d'environ une semaine. L'écart entre taux de levée finaux est aussi accru même si cet écart reste limité (8%).

4. Discussion des résultats de l'étude par simulation et conclusion

L'analyse par simulation des variations des résultats de germination et levée a déjà été entreprise sur un certain nombre d'espèces cultivées (betterave, Carrera et Dürr, 2003 ; moutarde blanche, Dorsainvil *et al.*, 2005 ; haricot, Moreau-Valancogne *et al.*, 2008 ; lin, Dürr *et al.*, 2008). Il s'agissait d'évaluer des risques statistiques liés aux conditions de levée afin d'orienter des décisions relatives aux techniques de semis de ces espèces : date de semis, densité, préparation du lit de semences, profondeur.

Dans le cas de la présente étude, les résultats attendus sont différents. Il s'agit **d'évaluer l'effet de différences entre génotypes sur la levée**, de mesurer l'ampleur des différences de levées qui en résulte, d'identifier les conditions dans lesquelles elles apparaissent et les paramètres du génotype qui influencent le plus les résultats de levée selon les différentes conditions de milieu.

Cette étude a été menée comme première approche montrant les moyens d'analyse et de diagnostic apportés par la modélisation : hiérarchie des paramètres compte tenu de l'ampleur de leurs effets sur la levée, hiérarchie des conditions environnementales. Un point essentiel est que **le modèle permet de passer d'une valeur ou d'un groupe de valeurs de paramètres, au chiffrage de l'effet de ces valeurs sur les résultats de levée.**

Une telle analyse des variations des résultats de la germination et de la levée est irréalisable sur le terrain, en raison à la fois de nombre de traitements expérimentaux, du nombre d'années de suivi et du type de variables acquises. L'analyse des effets de la variation des différents paramètres relatifs à la germination et à la levée doit conduire à l'identification des caractères les plus importants à considérer pour l'implantation d'une culture. Les différences de levées observées sont soit directement reliées à un des paramètres du modèle, soit résultent d'interactions entre ces paramètres. Dans tous les cas, les résultats obtenus dépendent de plus d'interactions avec les conditions environnementales. Certaines années, les écarts à la levée entre génotypes sont très faibles ; d'autres années, ils sont exacerbés du fait des conditions climatiques. Le nombre limité d'expérimentations sur le terrain rend dès lors difficiles des conclusions d'ordre général.

Le modèle permet en élargissant le nombre d'années et de dates de semis de chiffrer les moyennes des écarts, les écarts maximums, le nombre d'années où de tels risques apparaissent. Enfin, le diagnostic des sources de variations des résultats reste limité au champ par le **manque d'observations sur les causes de non-levées, très lourd et délicat à réaliser *in situ***. Nous avons déjà souligné les limites du modèle (écarts prévisions/observations, facteurs non pris en compte). L'étude menée n'est pas non plus exhaustive. Par exemple, l'interaction entre la date de semis une année climatique donnée et l'état du lit de semences mis en place n'a pas été prise en compte, ni celle entre l'état du lit de semences (structure et humidité) et la vitesse d'apparition d'une croûte. L'étude est aussi limitée à une zone climatique et un type de sol. Par ailleurs, le nombre d'années étudié reste faible pour établir des fréquences de risques : 20-30 années auraient été nécessaires.

L'étude présentée correspond donc à une première approche de l'ampleur des variations susceptibles d'être liées à la diversité génétique mise en évidence chez *M. tr.*. Les taux finaux de levées simulés pour les huit années retenues pour l'étude varient dans une très large gamme, 40 à 70% en moyenne. Mais les **différences moyennes de taux de levée** pour une même date de semis entre génotypes restent **limitées** de l'ordre de 5 à 10%, ce qui peut paraître assez faible. Les taux de levée des génotypes extrêmes créés différent en moyenne de 15 à 20%. Cela permet de chiffrer l'amélioration qui pourrait être obtenue au maximum, en moyenne sur plusieurs années si l'on regroupait dans un seul génotype tous les caractères favorables. Ce constat peut être rapproché du peu d'effort de sélection spécifique de ces étapes du cycle : l'effort porte sur des caractères prioritaires tels que la tolérance aux pathogènes, étant donné une plus grande importance des dommages causés et la forte variabilité de ces caractères entre génotypes.

Cependant, si l'on s'intéresse maintenant aux **effets de conditions extrêmes, les différences entre génotypes s'amplifient considérablement**.

Les plus importants facteurs de risques rencontrés ont été hiérarchisés et il apparaît en premier lieu que les croûtes de surface créent les plus grandes pertes à la levée. Ce résultat n'est pas spécifique à *M.tr.* : les croûtes représentent l'obstacle majeur à la levée des principales espèces cultivées (Arndt, 1965 ; Boiffin *et al.*, 1992, Nabi *et al.*, 2001). En considérant ce type de conditions pénalisant les levées, deux types de paramètres relatifs aux plantes paraissent impliqués et interviennent dans les résultats de levée avec pratiquement la même ampleur :

- **la force exercée par la plantule** qui est le paramètre le plus évident *a priori*. L'ampleur des différences dues à la diversité génétique observée sur ce paramètre est restée assez faible. Toutefois, on peut penser que nous l'avons sous-estimée. Les résultats obtenus sur le génotype A20 (Chapitre I) montre que les différences de force peuvent être plus importantes. Un chiffrage par simulation de la différence de taux de franchissement induite par cette différence de force confère un coefficient de

franchissement des croûtes pour A20 de 65%, à comparer à 40% pour la majorité des génotypes et 50% pour Paraggio (résultat non montré) ;

- **mais aussi la vitesse d'arrivée à la surface des plantes.** En effet, une arrivée rapide limite le risque d'occurrence d'une pluie et de la formation d'une croûte avant que les plantules n'aient atteint la surface. Les paramètres de la fonction d'allongement, la température de base de l'allongement ont des effets très importants sur cette cinétique, en particulier si les conditions sont froides. La cinétique de germination et donc les paramètres qui la déterminent peuvent aussi interagir sur la cinétique d'arrivée à la surface.

La deuxième cause de pertes importantes résulte des effets de conditions sèches lors du semis. Les **différences de *Ψ_{bg}*** mises en évidence entre génotypes peuvent contribuer à limiter de telles pertes. Les pertes par non-germination liées au stress hydrique ne sont cependant importantes que si le stress hydrique est très prolongé. Le risque le plus fréquent est un décalage de la cinétique de germination, qui entraîne un retard à l'arrivée en surface des plantules et ainsi augmente le temps au cours duquel une croûte peut se former.

Enfin, la mortalité due aux blocages sous des mottes est fonction du type de lit de semences préparé. En cas de semis en conditions motteuses, une amélioration des levées de l'ordre de 10% peut être attendue étant donné les valeurs des génotypes étudiés.

Les résultats de telles simulations doivent orienter les recherches de déterminisme génétique des paramètres présentant de la variabilité génotypique et étant à l'origine de variations importantes des résultats de levée.

L'étude menée aboutit à définir les priorités suivantes :

- **ne pas se limiter à la seule étude de l'étape de germination** et à s'intéresser aussi à l'étape d'allongement des organes en conditions hétérotrophes ;

- **analyser le déterminisme génétique de l'ensemble des paramètres permettant d'accélérer la date d'arrivée à la surface des plantules.** Nous avons en particulier constaté l'influence de modification des paramètres de la fonction et de la température de base d'allongement. L'amélioration de la capacité à germer face à un stress hydrique important peut aussi permettre d'éviter ou de limiter un retard d'arrivée à la surface ;

- **étudier les perturbations liées à l'effet des basses températures.** L'allongement est très perturbé à basses températures. Le raccourcissement des organes que nous avons observé à 10°C est un phénomène généralement rencontré chez toutes les espèces cultivées étudiées. Chez *M.tr*, ce raccourcissement est encore plus marqué. Des conditions froides sont fréquentes au moment de l'implantation, dans le nord-ouest de l'Europe surtout pour les cultures de printemps, mais aussi pour les semis tardifs d'hiver. La réduction de longueur finale constatée est importante et elle est de plus le

symptôme précurseur de l'apparition d'anormalité : l'hypocotyle prend une allure trapue, vitreuse et contournée qui empêche complètement la levée ;

- **étudier les possibilités d'améliorer la force exercée par les plantes.** Il s'agit d'identifier les caractéristiques sous-jacentes aux variations de forces. Par ailleurs, il faudrait aussi préciser les traits associés à une meilleure capacité à contourner les obstacles.

Il est enfin nécessaire de souligner que les résultats et les conclusions de cette étude sont contingents des caractéristiques de *Medicago truncatula*. Il est important de les connaître pour pouvoir resituer *M.tr.* parmi l'ensemble des espèces dont on chercherait à améliorer les caractères influençant la levée.

Les conclusions que nous avons tirées de l'ensemble des résultats présentés aux Chapitres I et II ont orienté le choix de plusieurs populations de lignées recombinantes, à partir de parents aux valeurs de paramètres contrastés pour les étapes et les facteurs considérés. Ce sont ces choix et le début d'une telle étude qui sont présentés au chapitre suivant.

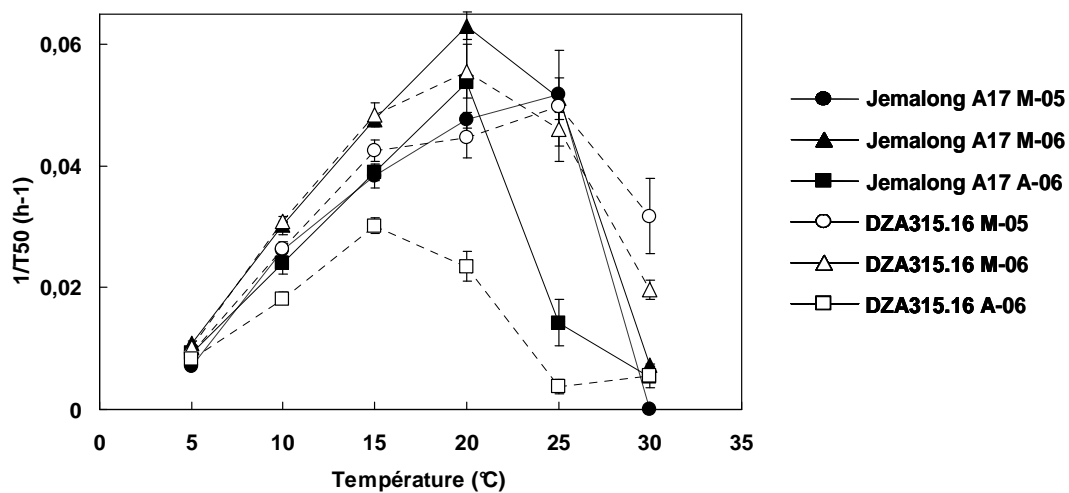
CHAPITRE III

DETERMINISME GENETIQUE DE CARACTERES DECRIVANT LA GERMINATION ET LE DEBUT DE CROISSANCE EN REPONSE A DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

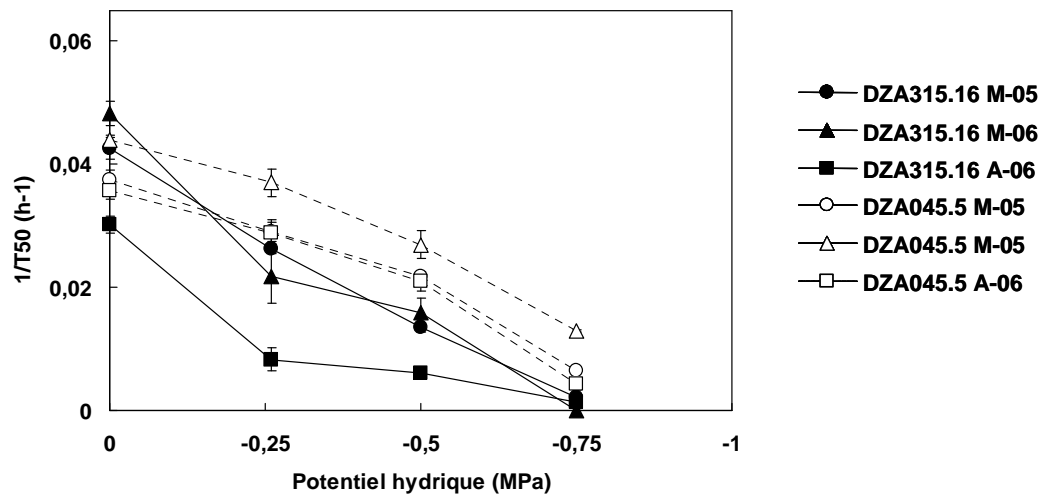
Les travaux présentés dans ce chapitre font partie d'un article en cours de rédaction :

Dias P, Brunel S, Durr C, Huguet T, Demilly D, Wagner MH, Teulat-Merah B. « QTL analysis of *Medicago truncatula* seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures »

(a) GERMINATION- TEMPERATURES SUPRA-OPTIMALES : LR4



(b) GERMINATION- FAIBLES POTENTIELS HYDRIQUES : LR1



(c) GERMINATION ET ALLONGEMENT - BASSES TEMPERATURES: LR5

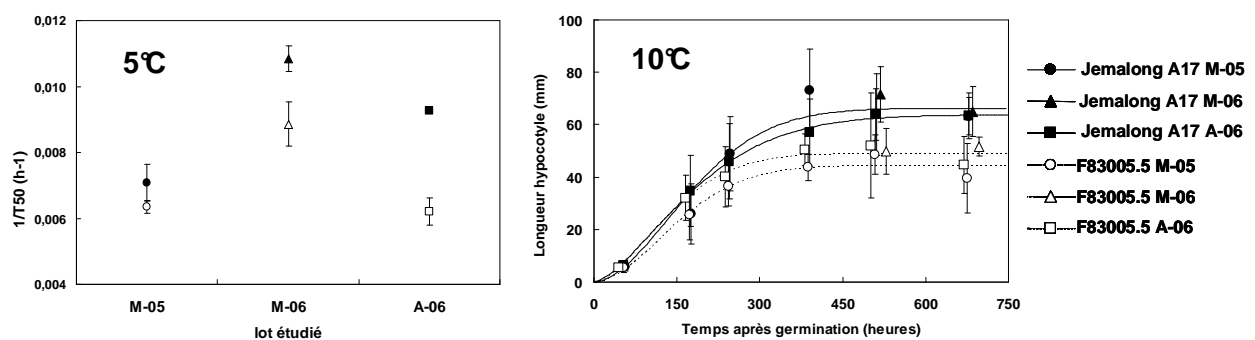


Figure 3.1 : Différences observées entre les génotypes parentaux (a) vitesse de germination ($1/T_{50}$) à 20 $^{\circ}C$, (b) vitesse de germination ($1/T_{50}$) en fonction du potentiel hydrique, (c) vitesse de germination ($1/T_{50}$) à 5 $^{\circ}C$ et longueur finale de l'hypocotyle à 10 $^{\circ}C$, en conditions hétérotrophes.

1. Démarche d'analyse du déterminisme génétique découlant de la diversité génétique observée

Dans le Chapitre I, la caractérisation écophysologique différents génotypes de *Medicago truncatula* nous a permis de (1) mettre en évidence la diversité de comportements de cette espèce dans des conditions environnementales variées au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe (2) dégager les différences génotypiques majeures en réponse à ces facteurs.

Dans le Chapitre II, nous avons évalué par expérimentations numériques les effets des différences génotypiques observées sur les paramètres du modèle sur les résultats de germination et de levée.

Au bilan, cette démarche nous a conduit à l'identification de plusieurs populations de lignées recombinantes (LR) adaptées pour l'étude du déterminisme génétique des comportements les plus variables en fonction de facteurs environnementaux majeurs (i.e. température, potentiel hydrique, obstacles mécaniques), dont les effets sur la germination et la levée dans des conditions agronomiques sont importants.

Parmi les comportements contrastés mis en évidence au Chapitre I, certains ne sont pas intégrés dans le calcul des paramètres du modèle. Ces comportements ont été observés pour des conditions environnementales non considérées dans le modèle, car peu fréquemment rencontrées dans un contexte agronomique. Cependant, ces conditions peuvent s'avérer importantes lors de certains semis. Par exemple, pour des cultures semées à plusieurs reprises au cours d'une année, ou encore lors de semis en serre, des températures supra-optimales peuvent pénaliser la levée (Valdes *et al.*, 1985 ; Cantliffe *et al.*, 2000 ; Argyris *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les paramètres du modèle sont de nature intégrative : ils synthétisent par un formalisme mathématique, un ensemble de caractéristiques mesurées (Chapitre I, § 1). L'acquisition d'un paramètre pour l'ensemble des individus d'une population en ségrégation est par conséquent délicate à l'heure actuelle en raison du grand nombre d'expérimentations à mener et du peu de moyens automatisés pour l'acquisition des données de phénotypage. Une alternative partielle consiste à identifier un comportement expliquant en partie la valeur du paramètre. Par exemple, chez *M.tr.*, les différences de vitesse de germination à basse température contribuent largement à la variabilité observée pour la température de base de germination *Tbgerm*, qui est un paramètre du modèle.

Ainsi, la caractérisation génotypique détaillée au Chapitre I permet de dégager les comportements présentant une variabilité intra-spécifique, et qui peuvent pour certains contribuer de façon importante à la variabilité des paramètres du modèle. Nous les rappelons ci-dessous et figure 3.1. En complément, la figure 3.2 rappelle les populations de LR connectées existantes issues des croisements entre les génotypes contrastés.

(d) OBSTACLES MECANQUES – A17 vs. A20

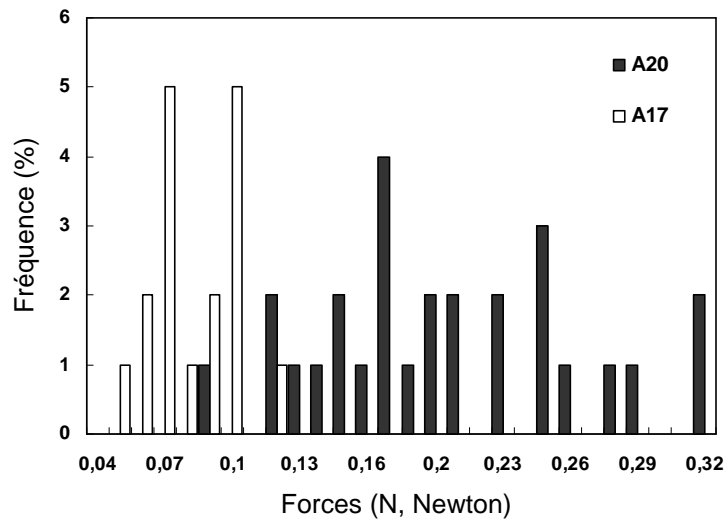


Figure 3.1 suite : Différences observées entre les génotypes (d) distributions des forces d'émergence des génotypes A20 et A17.

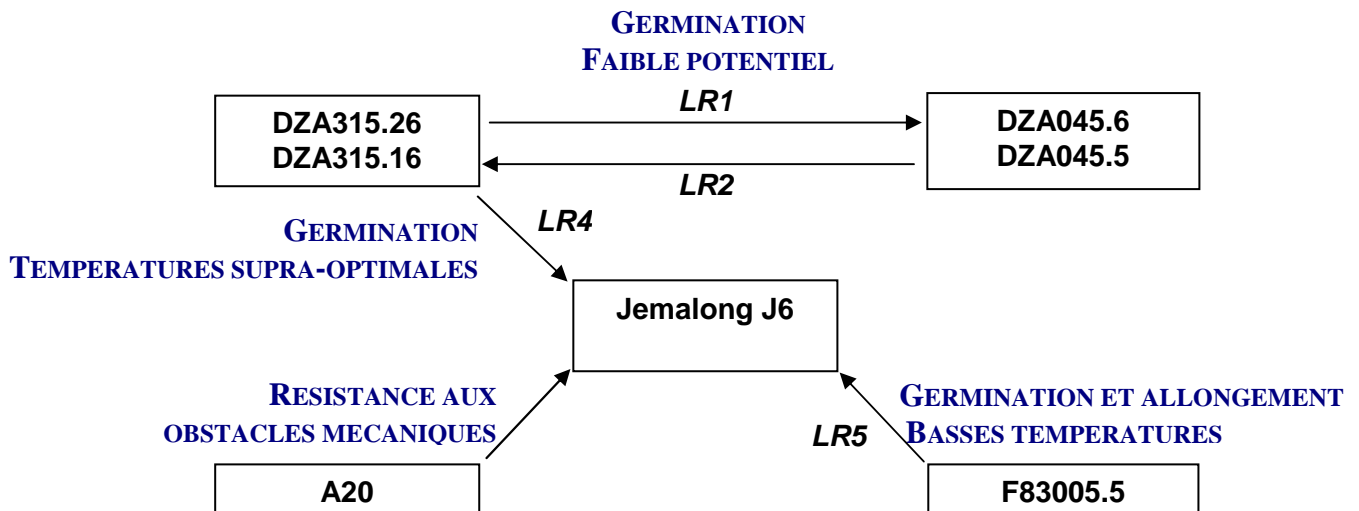


Figure 3.2 : Synthèse des principaux comportements contrastés identifiés à partir de la caractérisation écophysologique de *M.tr.*. Les génotypes contrastés parents de populations de lignées recombinantes disponibles sont indiqués. Le sens des flèches correspond au sens du croisement (mâle → femelle).

- Au cours de la germination, sur la gamme de températures testées (5 à 30°C), de fortes différences entre génotypes sont observées pour la vitesse de germination à partir de 20°C (Figure 3.1 a). En effet, alors que la vitesse de germination augmente linéairement en fonction de la température jusqu'à 15°C pour tous les génotypes, on distingue deux groupes de génotypes aux comportements contrastés entre 15°C et 20°C, i.e. un premier groupe dont la vitesse de germination continue à augmenter de façon linéaire et un second groupe pour lequel on observe une rupture de linéarité. Le génotype **Jemalong A17** fait partie du premier groupe et **DZA315.16**, du second. Jemalong J6 et DZA315.16 sont les parents de la population **LR4**¹.

- Au cours de la germination, les génotypes répondent différemment à des stress hydriques modérés (Figure 3.1 b). **DZA045.5** se distingue nettement par une vitesse et un taux final de germination supérieurs à ceux de **DZA315.16**, entre autres. DZA45.5 et DZA315.26 sont les parents de la population **LR1**¹.

- Au cours de la germination à basse température, **Jemalong A17** et **F83005.5** présentent des comportements contrastés: la vitesse et le taux final de germination de F83005.5 sont sensiblement réduits à cette température (Figure 3.1 c). Ces deux génotypes sont aussi contrastés au cours de la croissance hétérotrophe. Des différences ont été observées à basse température pour la longueur finale des organes, notamment sur celle de l'hypocotyle. Nous avons observé une réduction de la longueur finale de l'hypocotyle plus importante pour le génotype **F83005.5**, que pour celle de **Jemalong A17**, à 10°C. En outre, ces deux génotypes Les génotypes Jemalong J6 et F83005.5 sont les parents de la population **LR5**¹.

- Enfin, nous avons mis en évidence des différences génotypiques de force exercée par les plantules. Ces différences se sont révélées contrastées entre génotypes présentant des masses de semence très différentes. Les génotypes **A20** et **Jemalong A17** présentent des valeurs moyennes et des distributions de force très contrastées (Figure 3.1 d ; Tableau 1.8). La population issue du croisement de ces génotypes pourrait être utilisée pour analyser le déterminisme génétique des mécanismes sous jacents à la force exercée par les plantules.

A l'issue de nos observations, plusieurs travaux ont été engagés au sein de l'équipe. Ils concernent l'analyse du déterminisme génétique de caractères décrivant (1) la germination et le début de croissance, à 20°C en étudiant la population LR4, (2) la germination et la croissance hétérotrophe à basse température en étudiant la population LR5 (5°C et 10°C respectivement) et (3) la germination à bas potentiel hydrique (-0.50 MPa) en étudiant la population LR1.

¹ Aucune différence n'a été mise en évidence au niveau moléculaire entre Jemalong J6 et Jemalong A17, DZA315.16 et DZA315.26 et, DZA045.5 et DZA045.5 (Thoquet *et al.*, 2002, T.Huguet, communication personnelle). Ces lignées sont considérées comme identiques.

Dans le cadre de la thèse, nous nous sommes focalisés sur la recherche des bases génétiques des comportements au cours de la germination et du début de croissance dans des conditions de températures supra-optimales, en réalisant un phénotypage de la population LR4 à 20°C.

Les raisons de ce choix d'étude sont d'ordre chronologique. En effet, les différences sur la vitesse de germination à 20°C, entre génotypes et plus particulièrement entre Jemalong A17 et DZA315.16, parents de LR4, ont été les premières observées (Chapitre I). Nous avons eu aussi l'opportunité de caractériser cette étape à cette température en nous associant à une expérimentation menée à l'UR LEG¹ en 2006, dans le cadre de l'analyse de la variabilité génétique associée à la nutrition azotée réalisée sur la même population (thèse D. Moreau, 2007). En outre, la population LR4 est la première population créée et ainsi une des mieux caractérisées. Elle a fait l'objet de plusieurs phénotypages dans le cadre de la recherche de déterminants génétiques, impliqués dans le prélèvement de l'azote (D. Moreau, non publié), et à la date de floraison (Pierre *et al.*, 2008) notamment. Cette population est aussi étudiée par les autres équipes de l'UMR PMS² dans le cadre d'un projet ANR³ Génoplante. Par conséquent, la caractérisation de LR4 au cours de la germination et du début de croissance à 20°C, contribue à la mise en évidence de régions du génome impliquées dans la qualité physiologique des semences.

Ce choix relève aussi de multiples intérêts visant à mieux caractériser cette étape physiologique à cette température. L'étude de la germination à 20°C sur une espèce modèle doit permettre d'acquérir de meilleures connaissances sur les gènes et les mécanismes impliqués dans la thermo-sensibilité et d'avoir une référence pour cette température, généralement utilisée en laboratoire pour faire germer la plupart des espèces. Comme nous l'avons mentionné précédemment, d'un point de vue agronomique, l'effet de températures élevées au cours de la germination est également important à considérer, notamment pour la production de cultures en continu au cours de l'année, sous serre et au champ. Sur des cycles de production courts et à contre saison, ces espèces peuvent être confrontées à des pics de températures supra-optimales ou de légères variations au-delà de la température optimale, ce qui peut affecter considérablement la germination. Ce phénomène de thermoinhibition a été décrit chez des espèces légumières (Rowse et Finch-Savage, 2003 ; Nascimento et Pereira, 2007). La sélection de variétés pouvant supporter des pics de températures élevées sans que leur germination ne soit affectée pourrait être un véritable apport pour ce type de production.

Au-delà de ces aspects, le phénotypage réalisé pour LR4 est la démonstration d'une démarche (1) initiée par l'observation de contrastes génotypiques découlant d'une caractérisation écophysiological sur un ensemble de génotypes de la core collection et (2) reposant sur l'utilisation d'un dispositif de caractérisation haut débit, original.

¹ Unité Mixte de Recherche Génétique et Ecophysiologie des Légumineuses

² Unité Mixte de recherche Physiologie Moléculaire des Semences

³ ANR : Agence Nationale de la Recherche

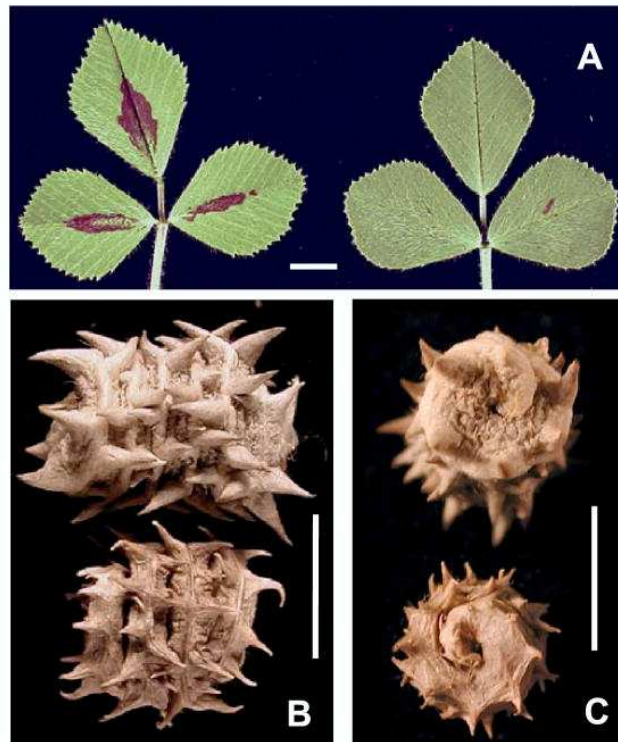


Figure 3.3 : Différences morphologiques entre Jemalong 6 et DZA315.16. (A) Pigmentation foliaire de Jemalong 6 (gauche) et DZA315.16 (droite). (B) Forme de la gousse de Jemalong 6 (dessus) et DZA315.16 (dessous). (C) Sens d'enroulement de la gousse : sens inverse des aiguilles d'une montre pour Jemalong 6 (dessus) et sens des aiguilles d'une montre pour DZA315.16 (dessous). Chaque segment représente 5 mm (photos d'après Thoquet *et al.*, 2002).

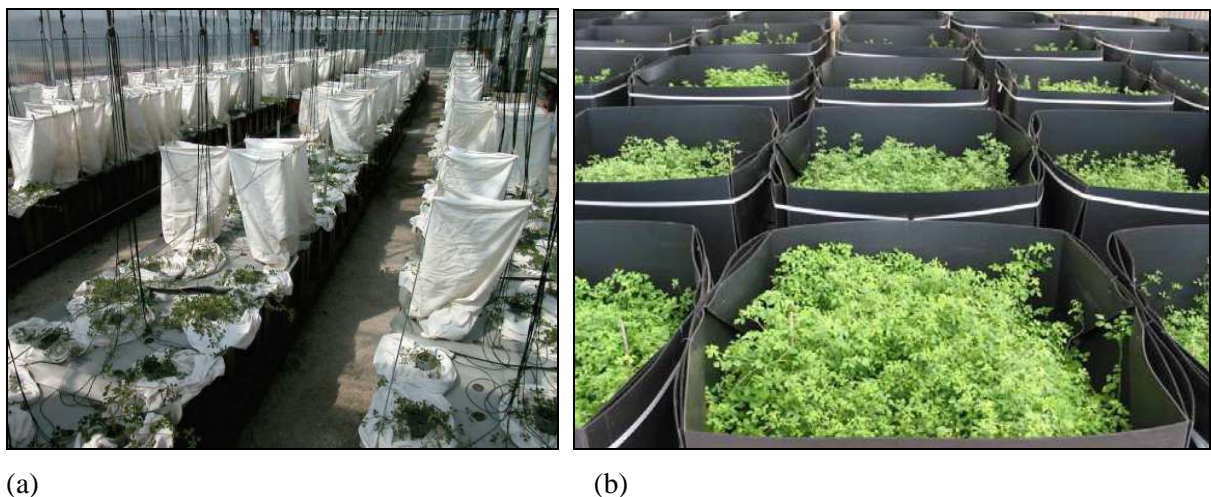


Figure 3.4 : (a) Production de lignées parentales pures. Dès que la floraison commence, les plantules sont isolées dans des sacs (coton) pour ne pas mélanger les gousses des différentes lignées. (b) Dispositif pour la multiplication des lignées recombinantes (Centre de Ressources Biologiques, INRA Mauguio).
(Source photo : http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/WildAccessions_Populations)

2. Identification de QTL impliqués dans les comportements observés au cours de la germination et du début de croissance à 20°C dans la population LR4

Afin d'identifier des QTL expliquant la variabilité génétique observée pendant la germination à des températures élevées pour cette espèce (20°C), nous avons utilisé la population de lignées recombinantes LR4, issue du croisement entre les génotypes Jemalong J6 et DZA315.16.

2.1. Caractéristiques des lignées parentales et création de la population LR4

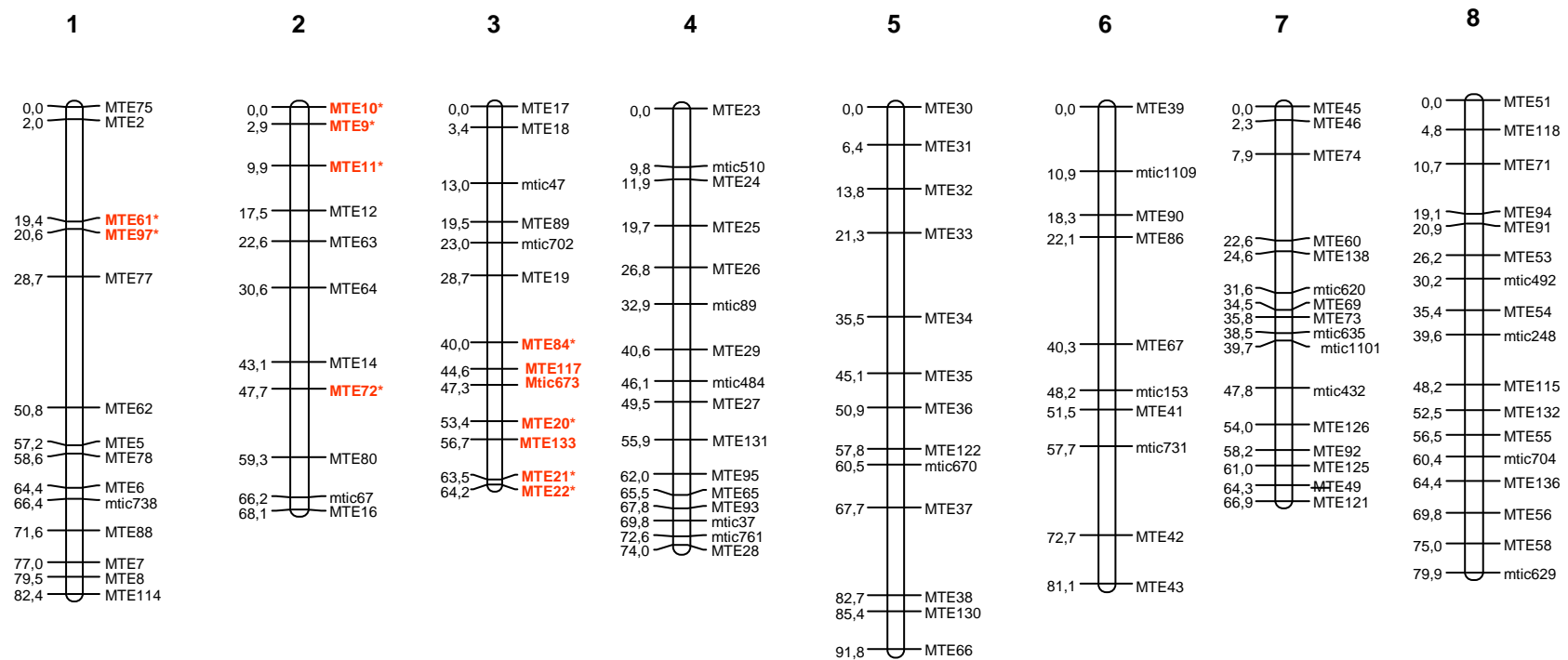
Le choix initial des génotypes parentaux de LR4 repose sur des critères **morphologiques**, des caractères liés au **développement** et à la **symbiose** (Thierry Huguet et Jean-Marie Prosperi, communication personnelle) et des critères **moléculaires** (Thoquet *et al.*, 2002). Les différences morphologiques relevées entre les deux parents concernent la taille, l'enroulement des gousses, la longueur des épines ainsi que la présence de taches sur la face supérieure de la feuille (Figure 3.3). D'autres caractéristiques ont été observées au cours du développement de la plante et discriminent les génotypes parentaux : le cultivar Jemalong A17 est plus précoce à la floraison que DZA315.16 ; sa ramification est moins dense mais les axes primaires sont plus longs ; son port est plus érigé ; il développe davantage de nodosités (<http://www.pi.csiro.au/ahpc/legumes/pdf>). La diversité moléculaire entre les deux génomes a été estimée en recherchant du polymorphisme avec des marqueurs neutres et s'élève à plus de 30% (Thoquet *et al.*, 2002). Enfin, les deux lignées parentales ont aussi été retenues car elles possèdent des quantités d'ADN identiques (Blondon *et al.*, 1994). Ceci permet de meilleurs taux de recombinaisons entre les génomes et par conséquent un meilleur éclatement des caractères au sein de la population de LR.

Depuis, les parents ont aussi été caractérisés sur d'autres aspects, en préalable à des études sur la population LR4, notamment sur l'analyse du prélèvement de l'azote (thèse D. Moreau, 2007) et sur l'étude du déterminisme génétique de la date de floraison (thèse J.-B. Pierre, 2008).

Pour la création de la population LR4, chaque lignée parentale a préalablement été auto-pollinisée afin de maximiser le pourcentage d'homozygotie (chez *M.tr.*, on estime à 1% l'hétérozygotie résiduelle due à la pollinisation entomophile). Le parent Jemalong J6 a été retenu comme parent femelle en raison de sa morphologie florale facilitant la pollinisation manuelle. Cette population a été créée par l'équipe du Laboratoire Symbioses et Pathologies des Plantes (INP-ENSAT¹, Thierry Huguet) et par celle du Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Luzernes méditerranéennes (UMR DGPC², Jean-Marie Prosperi ; Huguet *et al.*, 2004).

¹ Institut National Polytechnique - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse

² Unité Mixte de Recherche Diversité et Génome des Plantes Cultivées



*marqueurs distordus

Figure 3.5 : Carte génétique de la population LR4 (données génotypiques sur 179 lignées recombinantes fournies par T.Huguet). Les chiffres situés au dessus des chromosomes correspondent à leur numéro respectif. Les distances génétiques sont des distances de Kosambi.

2.2. Construction de la carte génétique à partir de la population LR4

Toutes les données de génotypage (marqueurs microsatellites) de la carte génétique utilisée nous ont été fournies par l'équipe de T. Huguet (INP-ENSAT). Elles ont été obtenues sur les lignées recombinantes en F7. A partir d'une carte cadre (nombre limité de locus MTE régulièrement répartis sur le génome) réalisée par T. Huguet, une nouvelle carte a été construite à l'UMR PMS, avec les données génotypiques de 179 LR en ajoutant des marqueurs Mtic pour la densifier. Les locus MTE constituant le cadre de la carte correspondent à des BAC¹ dont l'agencement constitue la carte physique. Ces locus MTE sont donc directement ancrés dans la carte physique du génome de *M. tr.* et permettent en plus de relier les différentes cartes génétiques de l'espèce. Chaque locus MTE correspond à une séquence d'ADN sur laquelle sont identifiés un ou plusieurs marqueurs microsatellites qui peuvent être présents pour plusieurs populations. Ces locus permettent donc de relier et de comparer les cartes génétiques de différentes populations en ségrégation et de créer des cartes consensus regroupant les cartes génétiques propres à chaque population. Au final, la carte génétique utilisée possède 110 marqueurs (espacés en moyenne de 6.2 cM) dont 60 locus MTE ancrés sur la carte physique et présents sur d'autres cartes génétiques. Cette carte couvre 608.4 cM, ce qui couvre bien le génome de *M.tr.*(Figure 3.5).

2.3. Expérimentations de phénotypage haut débit

Nous avons réalisé l'étude du déterminisme génétique des comportements de germination et de début d'allongement à des températures proches de 20°C. Deux essais ont été menés : en 2006 à l'UR LEG à Dijon (collaboration D. Moreau) et en 2008 à la SNES, à Angers. Pour les deux expériences, les graines ont été fournies par l'équipe de J.-M. Prosperi (INRA SGAP). Les graines proviennent de plantes cultivées et multipliées à Montpellier, en serre, sous photopériode et intensité lumineuse naturelles (Figure 3.4). Le semis a eu lieu dans les conditions naturelles, entre fin novembre et début décembre ce qui a permis une vernalisation naturelle. L'irrigation est régulée selon le stade de développement de la plante (3 plantes par bac de 0.5 m³; 0.2 L/jour 2 fois par semaine en début de cycle jusqu'à 0.6 L/jour 4 fois par semaine au moment de remplissage des graines). A partir du début de floraison, pendant deux mois, un apport de solution nutritive complète contenant 2.5 mM de nitrates a été effectuée (Liquoplant, Plantin SARL).

Pour les deux essais, les dispositifs expérimentaux ainsi que le nombre et le type de mesures effectuées sont différents, car nous n'avons pas disposé du même nombre de LR et de la même quantité de semences par LR.

¹ BAC : Bacterial Artificial Chromosome



Figure 3.6 : Dispositif expérimental dans les serres de l'UR LEG (Dijon). A gauche, traitement avec un faible apport en azote (0.625 mM de nitrates) ; à droite, traitement avec fort apport en azote (10 mM de nitrates).

2.3.1. Phénotypage réalisé à l'UR LEG de Dijon

Contexte de l'essai

L'expérience a été réalisée en janvier 2006 à l'UR LEG de Dijon dans le cadre d'une étude de la variabilité phénotypique associée au prélèvement de l'azote au cours de la croissance (thèse D. Moreau, 2007). Dans ce contexte, nous avons suivi les conditions expérimentales nécessaires à cette étude (e.g. vernalisation¹ sur graines imbibées, deux traitements d'apports en azote, inoculation par *R. Meliloti*). Les semences des 108 LR caractérisées ont été produites en 2004. Nous n'avons pas caractérisé les génotypes parentaux car nous n'avons pas disposé de semences du même lot.

Mesures réalisées au cours de la germination et du début d'allongement

Pour chacune des LR, l'ensemble des graines (entre 50 et 90) a été scarifié, pesé puis disposé dans une boîte de Pétri (diamètre 145 mm, contenant 8 mL d'eau déminéralisée), pendant 3 heures à température ambiante du laboratoire ($21.6^{\circ}\text{C} \pm 0.5$). Les boîtes ont ensuite été transférées pendant 3 jours dans des enceintes frigorifiques à $4.2^{\circ}\text{C} (\pm 0.6)$. Cette étape de vernalisation a pu dans une certaine mesure, homogénéiser la germination (stratification des semences). Les semences ont ensuite été entreposées de nouveau au laboratoire, à $18.7^{\circ}\text{C} (\pm 2)$ pendant 2 jours. Au cours de cette étape, 4 lectures de germination ont été réalisées sur chacune des boîtes et 2 photos par boîte ont été prises. Afin d'obtenir une vitesse d'allongement moyenne par lignée, les longueurs des axes racinaire-hypocotyle ont été mesurées à partir du traitement des 2 images (logiciel Image J). Une dernière lecture de germination a été réalisée 10 jours après le semis afin d'obtenir le pourcentage de germination final. Les mesures horaires de température ont été réalisées avec 4 sondes (Testo ; 177-T 3), réparties dans l'enceinte frigorifique puis dans le laboratoire.

Mesures des taux de plantules levées

Sur l'ensemble des graines germées par lignée, 2 à 3 graines ont été repiquées dans des pots de 1L contenant 50% de billes d'argile et 50% d'attapulгите, après inoculation de *Rhizobium meliloti* (souche 2011). L'étude visant à caractériser la variabilité phénotypique de la nutrition azotée, deux traitements contrastés pour l'apport en azote ont été appliqués sur les plantules ; nous avons suivi les levées sur un seul traitement (faible apport 0.625 mM de nitrates). Les pots ont été disposés en serre, à une température moyenne journalière de $17.9^{\circ}\text{C} (\pm 0.8)$ (consignes de températures jour/nuit à 21/15°C). Les mesures de températures ont été enregistrées à intervalles de 5 minutes par des sondes Delta Logger (Delta-T Devices ; DL2e). Au total, 13 pots par lignée et par traitement ont été répartis de façon aléatoire sur des 2 x 13 tablars (Figure 3.6). Nous avons réalisé une observation journalière pendant 6 jours, sur 10 pots par lignée pour le traitement avec la faible dose d'azote. Nous avons noté la date de levée de la première plantule dans le pot.

¹ Traitement par le froid pour raccourcir le cycle végétatif et avancer la date de floraison

Caractéristique phénotypée	Variable phénotypique	Température	Nombre de mesures
Masse semence	Masse moyenne Semence (MS, mg)	-	1 valeur moyenne sur 50-90 graines
Germination	Pourcentiles de germination T_i ($10 \leq i \leq 90$, h) T_f observé (%)	18.7°C (± 2)	1 valeur
Début d'allongement	Vitesse d'allongement (mm.h ⁻¹)	18.7°C (± 2)	1 valeur moyenne sur 50-90 graines germées
Levée	% plantules levées	17.9°C (± 0.8)	1 valeur moyenne sur 10 plantules à 6 temps d'observations

Tableau 3.1 : Récapitulatif des variables de phénotypage pour l'essai réalisé à l'UR LEG (Dijon)

Acquisition des données pour l'analyse de la variation phénotypique et l'analyse QTL

Les mesures réalisées au cours de la germination ont permis d'obtenir les cinétiques de germination. Les données ont été ajustées par l'équation de Gompertz, ce qui permet de calculer les temps de germination pour chaque pourcentage (e.g. T10,... T90). La dernière lecture de germination réalisée *in situ* a été réalisée pour donner la valeur du taux final (Tf) de germination observé.

Les images prises sur les boîtes de germination permettent d'acquérir la valeur d'une pente, correspondant au rapport entre la différence de longueurs de l'axe racicule-hypocotyle et la différence de temps, entre les deux prises d'image. Cette pente rend compte de la vitesse d'allongement au tout début de la croissance de la racicule (Vall). Nous avons relevé la date de germination de chaque semence ce qui a permis d'étudier la relation entre la vitesse d'allongement et la date de germination.

Enfin, on dispose des taux de plantules levées pour 6 dates d'observations réparties entre 6 jours et 11 jours après semis. A la dernière date d'observation, 100% des plantules ont levé pour l'ensemble des LR. La seconde date d'observation (LevtT2, 7 jours après le semis) est la plus adaptée pour rendre compte de la variation du taux de levées observé au sein de la population de LR ; elle a été utilisée pour l'analyse QTL. Un récapitulatif des variables obtenues dans l'expérience est présenté dans le Tableau 3.1.

2.3.2. Phénotypage réalisé à la SNES

Objectifs et démarche entreprise

Deux objectifs sont associés à cet essai. Il s'agissait d'une part de répéter l'expérience en optimisant le dispositif et les conditions expérimentales (i.e. 20°C constant et acquisition de résultats sur une série de répétitions i.e. 4 x 25 graines). D'autre part, cet essai a permis de tester dans le cadre des collaborations avec la SNES, une méthode de phénotypage haut débit combinant des prises d'images et leurs traitements automatisés. Les principes d'utilisation du banc de germination et de sa centrale d'acquisition d'images sont décrits dans l'encadré 3.1.

Des essais préalables ont été réalisés avec l'espèce *Medicago truncatula* pour adapter ou créer les algorithmes permettant d'obtenir les cinétiques d'imbibition, de germination et de début d'allongement, à partir de séries d'images traitées par le logiciel Image J (Demilly *et al.*, 2007). Les analyses d'images permettent de détecter de façon dynamique plus de 100 paramètres, tels que les coordonnées du centre d'inertie de la semence ou encore les variations de sa surface (...). Les valeurs de ces paramètres sont utilisées pour obtenir les cinétiques d'imbibition, de germination et d'allongement précoce de l'axe racicule-hypocotyle. Par exemple, pour la germination, il a été montré que le déplacement du centre d'inertie de la semence est le critère le plus fiable et le plus précis pour déclarer la semence germée. La mise au point de ce processus automatique de détection fait partie des projets développés par la SNES, sur des espèces cultivées, dans le cadre du CER Visioseme 2003-2006

Encadré 3.1

Description et principes d'utilisation du banc de germination et de la centrale d'acquisition des images

Le banc de germination est constitué d'une table de Jacobsen, dispositif de germination à alimentation hydrique continue, surmontée d'un bâti comportant 4 caméras enchâssées entre 3 ballasts pour l'éclairage.

La table de Jacobsen comporte une grille sur laquelle repose une aquanappe au dessus d'une cuve remplie d'eau à hauteur maximale de façon à assurer un contact avec la surface de semis continu et non limitant. La table est consignée à la température requise et contrôlée *via* un superviseur qui régule deux sondes. Un capot recouvre le plan de semis assurant le maintien des conditions hydrothermiques des semences.

Une centrale d'acquisition d'images, reliées à la table de Jacobsen, commande l'ouverture du capot à chaque prise de vues et stocke les images prises à la fréquence voulue.

Mise au point pour le phénotypage de LR4

Aux cours des essais, deux buvards de papier plat 140 x 200 (Whatman 3644) sont positionnés la veille du semis sur l'aquanappe sous chacune des caméras de manière à ce qu'ils s'équilibrent en humidité et température avant le semis. Des capteurs autonomes de températures (Testo ; 177-T3) sont placés sur les buvards sous chaque caméra (hors champ) pour enregistrer la température au cours de l'essai.

Conformément au plan de semis établi (Annexe 3.1), 400 graines sont semées sous chaque caméra à une distance de 1 cm chacune. Le grossissement moyen des caméras a été ajusté compte tenu de cette densité de semis sous chaque caméra. Il est de 53 pixels par centimètre pour cet effectif.



Banc de germination avec les 4 caméras



Centrale d'acquisition des images

et du front méthodologique des recherches sur les semences, du GEVES (Front IV) mené en concertation avec notre équipe de recherche.

Dispositif expérimental et acquisition des images

Les semences de 178 LR et des deux génotypes parentaux phénotypés sont issus d'un même lot, produit en 2006. Nous avons disposé d'environ 100 graines pour chacun des génotypes ce qui a permis de réaliser 4 répétitions de 25 graines. Afin de phénotyper l'ensemble des génotypes et des répétitions et compte tenu du nombre de graines pouvant être semées simultanément sur le banc, nous avons adopté un dispositif en 12 blocs incomplets car tous les génotypes ne sont pas phénotypés dans chaque bloc (Tableau 3.2 ; Annexe 3.1). Chaque bloc correspond à une expérience d'une semaine, durée permettant de suivre la cinétique de germination complète de chaque génotype (entre 3 et 6 jours après le semis selon le génotype). Le passage des 4 répétitions de tous les génotypes s'est déroulé sur 12 semaines, correspondant aux 12 blocs. Chaque semaine, la prise d'images est assurée par 4 caméras disposées le long du banc. Nous avons donc pris la précaution de semer chaque répétition sur une zone correspondant à une caméra différente afin de tenir compte d'une éventuelle hétérogénéité le long du banc. Nous avons aussi suivi un ordre de semis des LR périodique au cours des 12 semaines (i.e. les répétitions 1 ont été semées aux semaines 1, 2 et 3 ; les répétitions 2, aux semaines 4, 5 et 6 ; les répétitions 3, aux semaines 7, 8 et 9 ; les répétitions 4, aux semaines 10, 11 et 12) (Tableau 3.2). Pour chaque bloc, on a délimité 16 zones, sous chacune des 4 caméras. Chaque zone contient les 25 graines d'un même génotype, codées afin d'effectuer leur suivi individualisé. Ainsi, le dispositif est conçu pour faire en sorte que 25 graines de 16 génotypes (15 LR ou génotypes parentaux, et Paraggio, référence servant d'indicateur d'éventuels changements de conditions sur le banc au cours du temps et le long du banc) sont semées sous chaque caméra, pour chaque bloc.

Sur les bases des premières données acquises à l'UR LEG (2006) et afin de faciliter les détections de germination sur image, on a regroupé sous chaque caméra des LR germant à des vitesses voisines. Sans cette précaution, les radicules des LR les plus précoces peuvent empêcher de visualiser la germination des graines voisines des LR plus tardives. Des prises d'images ont été déclenchées toutes les 2 heures à partir du semis. La durée totale des prises d'images a varié de 3 à 6 jours en fonction des génotypes. Lorsque le taux final est atteint ou que la longueur des radicules ne permet plus de distinguer sur images les graines germées, les prises de vue sont arrêtées et une dernière lecture *in situ* est réalisée. Il a été vérifié au préalable sur les génotypes parentaux que le dispositif d'éclairage (i.e. qualité, intensité de la lumière et durée, à chaque prise d'image) était sans effet sur la vitesse de germination. Des mesures de teneur en eau des buvards disposés sous chacune des 4 caméras ont été réalisées pour vérifier l'homogénéité d'imbibition des buvards le long du banc. La teneur en eau des buvards (rapport de la différence entre poids humide et poids sec sur le poids sec) demeure très élevée, supérieure à 180%. Une tendance à une teneur plus faible a été observée pour les buvards disposés sous la caméra 4, mais les différences entre buvards ne sont pas significatives (au risque $\alpha = 5\%$).

Bloc = Semaine		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Groupe de géotypes													
G1	+P	x			x			x			x		
G4	+P	x			x			x			x		
G7	+P	x			x			x			x		
G10	+P	x			x			x			x		
G2	+P		x			x			x			x	
G5	+P		x			x			x			x	
G8	+P		x			x			x			x	
G11	+P		x			x			x			x	
G3	+P			x			x			x			x
G6	+P			x			x			x			x
G9	+P			x			x			x			x
G12	+P			x			x			x			x

Tableau 3.2 : Dispositif comprenant 12 blocs incomplets.

Blocs (= Semaine) : durée de passage sous une caméra d'un groupe de géotype (du semis jusqu'au temps nécessaire pour atteindre le taux final de germination, entre 3 et 6 jours)

Incomplets : sur un bloc (semaine) tous les géotypes ne sont pas phénotypés (4 caméras x 15 emplacements disponibles sous chaque caméra soit 56 géotypes)

Au cours de l'expérience, la moyenne de température des 4 sondes disposées sous chaque caméra banc est de 20.1°C (± 0.6). Les variations de températures au cours des 12 semaines et entre les 4 sondes sont comprises entre 19.6°C et 20.9°C. Les moyennes de chaque semaine en considérant les 4 sondes, et de chaque caméra en considérant les 12 semaines sont significativement différentes ($p\text{-value} < 0.0001$). Ces variations sont essentiellement cycliques et probablement dues au circulateur sous le banc (Annexe 3.2).

Traitement des images et génération des données pour l'analyse QTL

L'acquisition et le traitement des données sont séquentiels et s'effectuent en 3 étapes :

- toutes les images sont d'abord stockées dans des répertoires hebdomadaires, puis classées par caméra. Les images sont ensuite traitées avec le logiciel Image J en appliquant toujours la même macro type. Les fichiers de sortie regroupent les résultats bruts des mesures (référence des images, position du centre d'inertie, surface, longueur des semences...) ;
- après le traitement des images par Image J, un traitement automatisé des fichiers de sortie permet d'identifier les 16 zones des images et de créer un fichier de résultats par génotype regroupant les répétitions. Ce fichier donne à la fois les valeurs de chaque répétition et les valeurs cumulées des répétitions (tenant compte du suivi individualisé des graines de chaque répétition) pour chaque génotype ;
- les fichiers de résultats sont ensuite importés dans une matrice de résultats regroupant les valeurs de chaque répétition et les valeurs cumulées.

Les caractères phénotypés retenus pour l'analyse QTL sont présentés dans le tableau 3.3. Ils concernent des variables relatives aux caractéristiques initiales des semences, à la phase d'imbibition et aux étapes de germination et de début de croissance de la radicule.

Caractéristique phénotypée	Variable phénotypique	Caractéristique de la mesure
Caractéristique Initiale Semence	Masse moyenne Semence (MS, mg)	1 valeur par répétition
	Surface Initiale Semence (SSi mm ²)	1 valeur
Imbibition	Vitesse d'imbibition, %S (mm ² .h ⁻¹)	% moyen d'augmentation de la surface d'une graine entre t=0 (semis) et t=+8 h uniquement sur les graines non germées à t≤8h
Germination	Pourcentiles de germination Ti (10≤i≤90, h)	1 valeur par répétition Calculés par régression linéaire (intervalle de temps Δt=2 heures) en tenant compte des répétitions séparément (autant de Ti que de répétitions)
	Temps Moyen de Germination TMG (h) (1)	1 valeur par répétition
	Taux final observé Tf (%)	Mesures <i>in situ</i> 1 valeur par répétition
Début d'allongement	Vall (mm.h ⁻¹)	Vitesse d'allongement de l'axe racicule-hypocotyle entre 4 et 10h après germination (en prenant pour référence le temps de germination de la 1 ^{ère} graine germée sur les 25 graines) 1 valeur par répétition

Tableau 3.3 : Récapitulatif des variables phénotypées pour l'essai réalisé à la SNES.

(1) le TMG correspond à la moyenne des Ti ; sa valeur est classiquement donnée en référence par les tests ISTA¹.

¹ ISTA : International Seed Testing Association

2.4. Méthodes d'analyse de la variation phénotypique et d'identification de QTL

Dans cette partie, nous présentons les traitements statistiques des données de phénotypage de la population LR4 qui ont été nécessaires pour réaliser l'analyse de la variation phénotypique et l'identification de QTL.

2.4.1. Analyses statistiques de la variation phénotypique

Une analyse de variance a été réalisée pour les données de l'essai mené à la SNES, pour lequel nous avons disposé de plusieurs valeurs pour les caractères mesurés (modèle linéaire général, procédure GLM, SAS V8, 2001). Une éventuelle hétérogénéité de l'expérimentation peut être caractérisée en testant les effets bloc et caméra. De tels effets peuvent provenir de variations de conditions (i.e. température, teneur en eau des buvards...) entre les 12 semaines de l'essai et entre les emplacements de semis le long du banc de germination, respectivement. Deux modèles d'analyses de variance simple ont donc été utilisés.

Le premier modèle, à valeur informative, permet de caractériser l'hétérogénéité de l'expérience. Les sources de variations des caractères pouvant être expliquées par un effet LR et des effets bloc et caméra :

$$P = \mu + G + X + Y + \varepsilon$$

Le second modèle est celui utilisé pour générer des moyennes ajustées qui ont été utilisées pour l'analyse QTL en tenant de l'effet caméra, seule source environnementale de variations pour laquelle nous disposons de plusieurs valeurs par LR :

$$P = \mu + G + X + \varepsilon$$

P est la valeur phénotypique du caractère du génotype ; μ la moyenne du caractère pour l'ensemble des génotypes, blocs et caméras ; G représente l'effet du génotype ; X , la part relative de la caméra ; Y , la part relative du bloc ; ε , la résiduelle du modèle.

Une comparaison de moyennes des caractères a été effectuée pour chaque bloc et chaque caméra (test SNK, au risque $\alpha = 0.05$). Ces analyses statistiques ont été réalisées en deux temps. Les effets ont d'abord été testés sur le génotype témoin Paraggio, présent dans tous les blocs et sous toutes les caméras dans chaque bloc, puis en considérant toutes les LR. Enfin, les corrélations entre caractères ont été analysées (STATGRAPHICS centurion version XV.II).

2.4.2. Méthodes d'analyses pour l'identification de QTL

L'identification de QTL a été réalisée avec le logiciel PLABQTL (version 1.2, 2006) développé par Utz et Melchinger (1996). Ce programme permet de rechercher des QTL par cartographie d'intervalle simple (Simple Interval Mapping, SIM) ou composite (Composite Interval Mapping, CIM), en utilisant une approche par régression multiple, décrite par Haley et Knott (1992).

Effet	Vitesse Imbibition (%)	T20	T50	TMG	T70	T90	Tfinal	Vitesse allongement (mm ² .h-1)
caméra	0.77 ns	7.82 **	9.34 **	11.54 ***	9.85 ***	4.24 ns	2.75 ns	0.37 ns
<i>caméra discriminante</i>	-	4	4	4	4	-	-	-
bloc	0.59 ns	1.83 ns	2.72 ns	3.13 *	2.68 ns	1.51 ns	1.69 ns	1.77 ns
<i>bloc discriminant</i>	-	-	-	{4-9}/{7}	-	-	-	-

Tableau 3.4 : Analyse de variance testant les effets caméra et bloc (valeur de F calculée, Fischer) pour la vitesse d'imbibition, d'allongement et les temps et le taux final de germination pour le génotype Paraggio en prenant en compte l'ensemble des répétitions.

	Vitesse Imbibition (%)	T20	T50	TMG	T70	T90	Vitesse allongement (mm ² .h-1)
Effet lignée	2.73 ***	2.48 ***	2.49 ***	3.48 ***	2.51 ***	2.43 ***	2.13 ***
Effet caméra	0.01 NS	73.31 ***	64.37 ***	75.93 ***	56.32 ***	20.75 ***	4.35 *
<i>caméra discriminante</i>	-	1-2-3	1-2-3	1-2-3	1-2-3	1-2-3	2-{1-3}
Effet bloc	12.07 ***	28.10 ***	20.21 ***	24.06 ***	14.68 ***	9.27 ***	1.08 NS
<i>bloc discriminant</i>	12-6	9- {3-6-7}	9- {5-6-7}	9- {5-6-7}	9- {5-6-7}	{4-9}- {5-7}	2-12

Tableau 3.5 : Analyse de variance testant les effets LR, bloc et caméra (valeur de F calculée, Fischer) pour la vitesse d'imbibition, d'allongement et les temps et le taux final de germination pour les LR en prenant en compte les 3 répétitions.

	Vitesse Imbibition (%)	T20	T50	TMG	T70	T90	Vitesse allongement (mm ² .h-1)
Effet lignée	1.97 ***	1.46 **	1.65 ***	2.21 ***	1.81 ***	1.98 ***	2.16 ***
Effet caméra	0.3 NS	35.68 ***	36.35 ***	39.91 ***	35.50 ***	12.07 ***	3.95 *
<i>caméra discriminante</i>	-	1-2-3	1-2-3	1-2-3	1-2-3	1-2-3	1-2-3

Tableau 3.6 : Analyse de variance testant les effets LR et caméra (valeur de F calculée, Fischer) pour la vitesse d'imbibition, d'allongement et les temps et le taux final de germination pour Les LR en prenant en compte les 3 répétitions.

Pour les trois analyses, quand les effets sont significatifs, la caméra ou le bloc discriminant (test SNK au risque $\alpha = 0.05$). La caméra ou le bloc discriminant est celui dont la valeur moyenne est significativement différente.
ns : non significatif à $P = 0.05$, *, ** et *** : significatif à $P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement.

Nous avons d'abord réalisé des permutations des données phénotypiques (1000 permutations par caractère) pour déterminer les valeurs seuils de détection de QTL propres à chaque caractère (Churchill et Doerge, 1994). La seconde étape a consisté à identifier les QTL par SIM en utilisant ces valeurs seuils.

Pour augmenter le pouvoir de détection (contrôle du fond génétique en prenant des données de marquage comme cofacteurs, meilleure estimation des effets des QTL présents sur un même chromosome ; Jansen et Stam, 1994 ; Utz et Melchinger, 1994 ; Zeng, 1994), nous avons réalisé une analyse par CIM, prenant en compte le marqueur le plus proche de chaque QTL identifié par SIM comme cofacteur. Ils ont été déclarés manuellement pour l'expérience de l'UR LEG en raison d'un trop faible nombre de données phénotypiques à l'origine d'un surnombre de co-facteurs sélectionnés automatiquement. Pour l'expérience à la SNES, ils ont été sélectionnés automatiquement par l'analyse (matrice de données phénotypiques complète sur l'ensemble des LR). Le logiciel utilisé utilise la méthode de la décroissance de LOD de 1 point pour estimer l'intervalle de confiance.

2.5. Résultats de l'analyse de la variation phénotypique et de l'identification de QTL

Dans cette partie, nous allons d'abord présenter les résultats des traitements statistiques des données acquises sur le banc de germination à la SNES. Puis, nous présenterons pour les deux expériences, les moyennes et gammes de variation des caractères au sein de la population LR4, les corrélations entre caractères et enfin, les QTL identifiés. Concernant la germination, ce sont les valeurs des temps répartis sur l'ensemble de la cinétique qui ont été analysées (T20, temps pour 20% de germination ; T50 ; T70 ; T90 et TMG, pour le phénotypage à la SNES).

2.5.1. Analyse des effets LR, bloc et caméra

Concernant le génotype témoin Paraggio, l'analyse de variance des caractères n'a pas montré d'effet bloc significatif, à l'exception du TMG (Tableau 3.4).

Au cours de l'expérience, nous avons observé *in situ* que les cinétiques de germination des graines semées sous la caméra 4 étaient plus lentes que celles semées sous les trois autres caméras. Les analyses de variance réalisées sur le génotype témoin Paraggio ont confirmé cette observation (Tableau 3.5). En effet, à l'exception du T90, des différences significatives sont observées entre caméras pour les temps de germination. La comparaison des moyennes de chaque répétition discriminent la répétition 4 correspondant aux données acquises sous la caméra 4 (test SNK au risque $\alpha = 0.05$).

Variable phénotypique	Moyenne	Min	Max
Masse Semence (mg) : MS	5.8	4.4	7.0
Germination (h)			
T20	73.1	63.5	82.0
T50	78.0	68.8	88.4
T70	82.1	72.4	96.4
T90	90.2	78.6	102.4
Vitesse d'allongement: Vall (mm.h⁻¹)	0.356	0.104	0.596
Taux de plantules levées à T2 : LevT2 (% , 7 jours après semis)	6.5	0	10

Tableau 3.7 : Valeurs moyennes, minima et maxima des variables phénotypées à l'UR LEG. Il n'y a qu'une répétition par caractère à l'exception de Vall pour lequel les mesures ont été réalisées individuellement sur 50 à 90 graines germées.

Variable phénotypique	Moyenne	Min	Max	Moyennes parentales (±écart-type)	
				Jemalong A17	DZA315.16
Masse Semence (mg) : MS	4.12	2.44	5.37	4.41 (±0.24)	4.35 (±0.16)
Surface Initiale Semence (mm²) : SSi	6.93	4.41	9.47	8.33 (± 1.27)	8.45 (± 1.14)
Imbibition (% augmentation de surface entre 0-8heures,%)	52.5	18.7	88.7	31.8 (±20.3)	26.6 (±16.3)
Germination(Ti, h)					
T20	16.6	13.6	20.2	15.9	18.6
T50	20.5	16	25.8	18.5	23.7
T70	24.1	19.1	34.7	21.0	27.3
T90	31.3	23.4	52	26.2	36.5
TMG	22.4	18.8	28.5	20.6	24.4
Tf observé	99.3	94.3	100	100	98.7
Vitesse d'allongement: Vall (entre 4 et 10h après germination, mm.h⁻¹)	0.389	0.206	0.572	0.526	0.530

Tableau 3.8 : Valeurs moyennes, minima et maxima des variables phénotypées à la SNES. Les valeurs des temps de germination Ti et de vitesse d'allongement sont les moyennes ajustées.

L'effet caméra n'est pas expliqué par les variations de températures observées le long du banc, car les températures enregistrées sous la caméra 4 dans chacun des blocs ne sont pas discriminantes (§ 2.3.2 b, Annexe 3.2). Par contre, comme la teneur en eau des buvards disposés sous la caméra 4 tend à être inférieure aux teneurs en eau des buvards disposés sous les 3 autres caméras, l'effet caméra pourrait être dû à un gradient de teneur en eau le long du banc, pouvant provenir d'une légère inclinaison du banc. Pour s'affranchir de la forte hétérogénéité introduite par les données de la répétition 4, nous avons décidé de les retirer de l'analyse des données des LR et l'analyse QTL. Par contre, les données de masse et de surface initiale des semences étant indépendantes des effets bloc et caméra, l'ensemble des données a servi aux analyses sur les LR. Pour ces deux variables, l'effet LR est très hautement significatif (non présenté). Les données des autres variables ont été soumises aux deux analyses de variance dont les résultats sont présentés dans les tableaux 3.5 et 3.6. La première analyse a permis de caractériser les effets LR, bloc et caméra ; la deuxième a été exécutée en considérant les effets LR et caméra uniquement. Les résultats de la première analyse montrent un effet LR très hautement significatif pour l'ensemble des caractères. Cependant, on observe des effets bloc et caméra, pour la plupart des caractères, et la contribution relative de ces effets est supérieure à celle obtenue pour l'effet LR (Tableau 3.5). L'effet caméra reste plus important que l'effet bloc malgré l'élimination des données de la caméra 4.

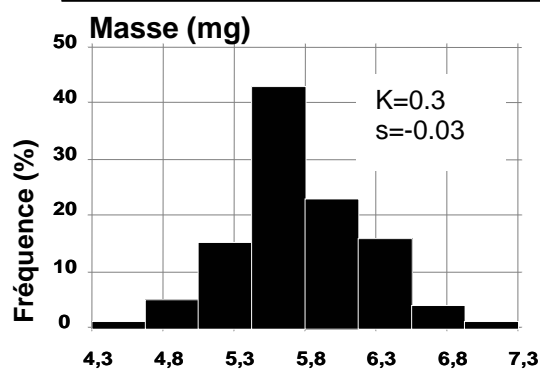
La deuxième analyse a fait ressortir un effet LR sur les temps de germination et la vitesse d'allongement. De nouveau, l'effet caméra est plus important que l'effet LR (Tableau 3.6). Pour ces caractères, étant donné qu'il n'y a qu'une seule valeur de chaque variable pour chaque LR à l'intérieur de chaque bloc, il n'est pas possible de calculer des moyennes ajustées tenant compte de l'effet bloc. Par contre, des moyennes ajustées ont été générées par régression sur l'effet caméra par la méthode des moindres carrés (SAS V8, 2001).

2.5.2. Moyennes et gammes de variation des caractères

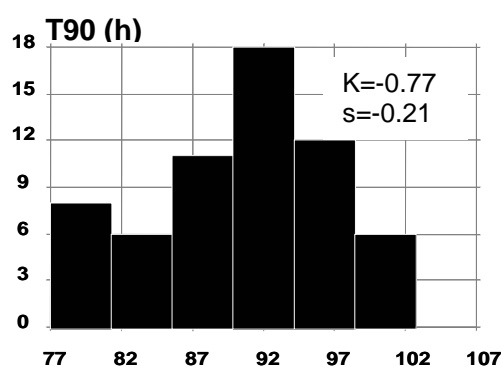
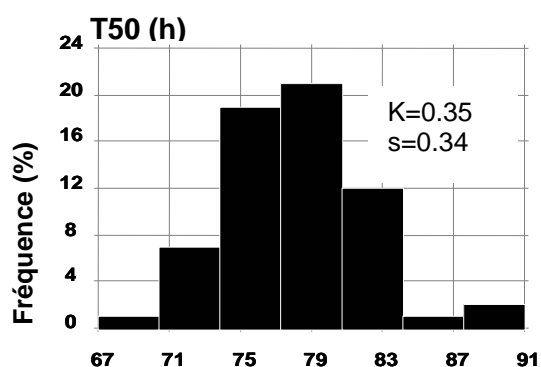
La variation phénotypique observée au sein de la population LR4 est présentée à l'aide des tableaux récapitulatifs des moyennes, des minima et des maxima de chaque caractère mesuré, sur l'ensemble des LR (Tableaux 3.7 et 3.8). Les histogrammes de distribution des moyennes sont présentés dans les Figures 3.7 et 3.8.

Pour chaque caractère, une large gamme de variation est observée au sein de la population de LR. Les différents caractères étudiés présentent une variation continue, typique d'un caractère quantitatif avec une distribution normale comme l'indiquent les valeurs des coefficients de Kurtosis (mesurant le degré d'écrasement de la distribution) et skewness (rendant compte du degré d'asymétrie de la distribution ; Figures 3.7 et 3.8). Cependant, les distributions du taux de plantules levées (UR LEG, LevT2) et du taux final de germination (SNES, Tfinal ; non montré) sont asymétriques car les valeurs les plus élevées correspondent à des valeurs finales (i.e. 100% de plantules levées et 100% de graines germées).

Caractéristique des Semences



Germination



Début d'allongement et Levées

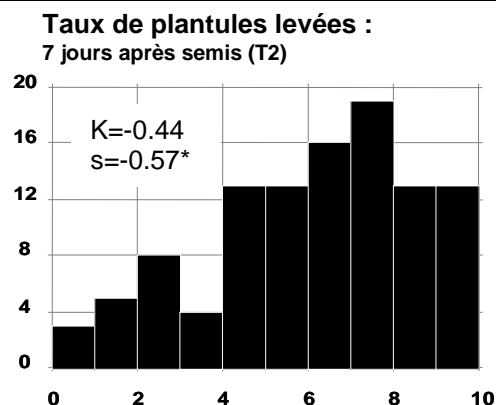
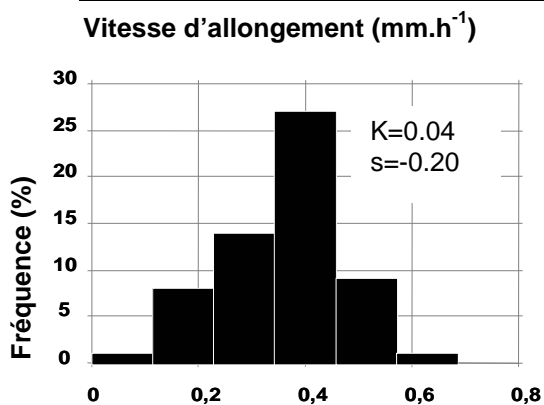
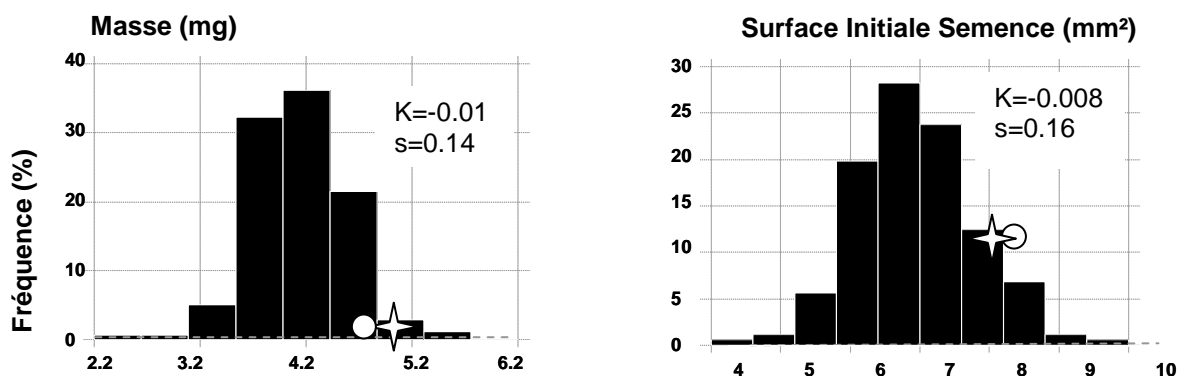
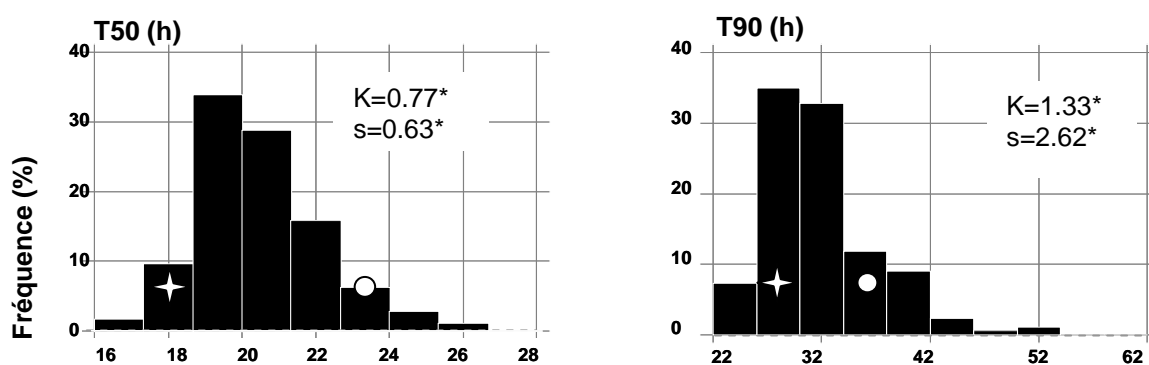


Figure 3.7 : Histogrammes de distribution des valeurs des caractères phénotypés (LR4, UR LEG). Les valeurs indiquées correspondent aux résultats des tests de Kurtosis (K) et de skewness (s). Les valeurs suivies du symbole * montrent un écart à la normalité sur un des deux critères (K, degré d'écrasement et s, degré d'assymétrie).

Caractéristiques des Semences



Germination



Imbibition et Début d'allongement

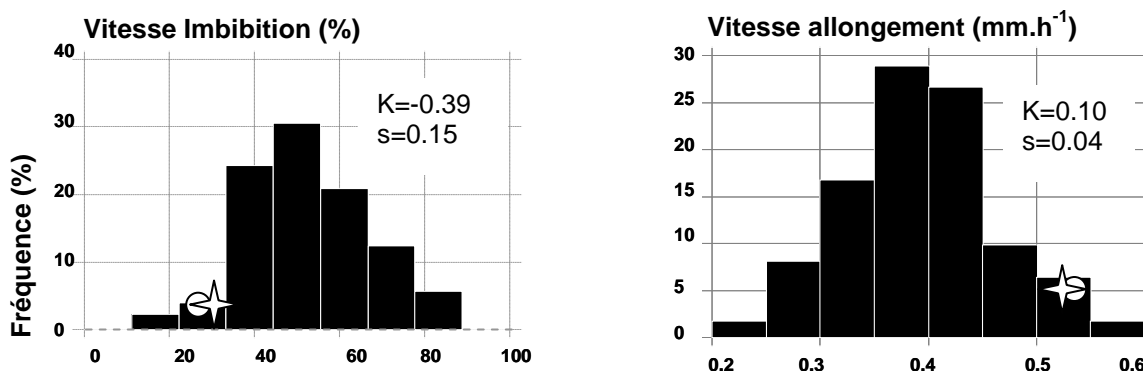


Figure 3.8 : Histogrammes de distribution des valeurs des caractères phénotypés (SNES).

Les valeurs indiquées correspondent aux résultats des tests de Kurtosis (K) et de Skewness (s). Les valeurs suivies du symbole * montrent un écart à la normalité sur un des deux critères (K, degré d'écrasement et s, degré d'assymétrie). Les valeurs des vitesses d'allongement sont les valeurs de LSmeans.

Les valeurs des génotypes parentaux sont représentées par les symboles ☆ pour Jemalong A17 et ○ pour DZA315.16.

Les semences des LR utilisées à l'UR LEG présentent une masse (MS) moyenne et une gamme de variation plus élevées que celles utilisées à la SNES. Les semences utilisées dans les deux essais ont été produites dans les mêmes conditions de production (en serre, INRA Mauguio) mais des années différentes. L'ampleur des variations de MS est cependant de même ordre pour les deux lots utilisés, les différences entre valeurs extrêmes représentant environ 50% de la valeur maximale. La surface initiale de la semence (SSi) ainsi que la vitesse d'imbibition (%S, i.e. pourcentage d'augmentation de surface entre 0 et 8 heures après le semis), qui ont été mesurées à la SNES, présentent aussi une grande variation (50% et 80 % respectivement, de la valeur maximale). Il y a peu d'écart entre les parents comme d'ailleurs pour la MS (Tableau 3.8).

Les variations des temps de germination sont moins importantes, avec une différence entre les valeurs extrêmes représentant entre 20% (UR LEG) et 30% (SNES) de la valeur maximale. Cette différence entre les deux expériences peut être attribuée au fait que les semences ont été stratifiées à l'UR LEG ce qui a eu pour effet d'homogénéiser dans une certaine mesure leur germination. La valeur du TMG est très proche de la valeur du T50. Pour l'expérience menée à la SNES, les valeurs des génotypes parentaux sont contrastées avec les valeurs les plus faibles pour Jemalong (germination plus rapide, déjà observée lors des caractérisations précédentes, Chapitre I). Ce comportement contrasté des parents conforte le choix de LR4 pour étudier le déterminisme génétique du comportement de germination à cette température. Par ailleurs, on observe 25% de transgression (i.e. lorsque les LR présentent des valeurs plus extrêmes que celles des génotypes parentaux). Toutes les LR phénotypées à l'UR LEG atteignent 100% de germination ce qui n'est pas le cas des LR phénotypées à la SNES (quelques LR n'atteignent pas 100% de germination finale ; Tableau 3.8). Les vitesses d'allongement (Vall) présentent une variation importante (80% et 50% de la valeur maximale, pour l'UR LEG et la SNES, respectivement). Les valeurs des génotypes parentaux phénotypés à la SNES sont proches. Enfin, le taux de plantules levées mesuré 7 jours après le semis (LevT2) présente une variation maximale avec des lignées n'ayant pas levé et d'autres ayant atteint 100% de levée.

2.5.3. Relations entre les différents caractères phénotypés

La matrice des corrélations présente les valeurs des coefficients de Pearson et leur degré de signification (Tableaux 3.9 a et b). La surface initiale de la semence (SSi) se révèle corrélée à la masse. En dehors de cette relation, la masse n'est corrélée ni aux vitesses de germination, ni à la vitesse d'allongement ou encore le taux de levées. La corrélation entre les différents temps mis pour germer est très fortement significative pour les deux expériences. Cela indique que la vitesse de germination initiale se maintient au long de la cinétique. La SSi est négativement corrélée à la vitesse d'imbibition pour l'expérience à la SNES. On peut supposer que plus les semences ont une petite surface, plus elles sont en contact plus étroit avec le film d'eau et sont donc rapidement imbibées.

(a)	MS	T20	T50	T70	T90	Vall
T20	-0,207 ns					
T50	-0,205 ns	0,91 ***				
T70	-0,194 ns	0,781 ***	0,969 ***			
T90	-0,207 ns	0,535 ***	0,819 ***	0,925 ***		
Vall	0,155 ns	0,091 ns	0,032 ns	-0,01 ns	-0,095 ns	
levT2	0,077 ns	-0,216 ns	-0,236 ns	-0,224 ns	-0,147 ns	0,149 ns

(b)	MS	SSi	%S	T20	T50	TMG	T70	T90	Tfinal
SSi	0.494 ***								
%S	0.038 ns	-0.653 ***							
T20	0.071 ns	-0.095 ns	0.004 ns						
T50	0.065 ns	-0.077 ns	-0.032 ns	0.859 ***					
TMG	0.041 ns	-0.028 ns	-0.093 ns	0.791 ***	0.934 ***				
T70	0.051 ns	-0.067 ns	-0.043 ns	0.744 ***	0.942 ***	0.920 ***			
T90	0.040 ns	0.042 ns	-0.101 ns	0.484 ***	0.722 ***	0.774 ***	0.787 ***		
Tfinal	0.135 ns	0.095 ns	0.106 ns	-0.091 ns	-0.128 ns	-0.157 *	-0.136 ns	-0.097 ns	
Vall	0.076 ns	0.037 ns	0.178 *	-0.229 **	-0.227 **	-0.260 **	-0.274 **	-0.217 **	0.061 ns

Tableaux 3.9 : Matrice de corrélations entre les variables phénotypées à (a) l'UR LEG et (b) la SNES. Les coefficients de corrélation de Pearson sont donnés sur la 1^{ère} ligne
*, **, *** : corrélation significative au seuil de 5%, 1% et 0.1%, respectivement
ns : corrélation non significative.

Concernant les autres variables, pour l'expérience menée à l'UR LEG, aucune corrélation n'a été observée entre les temps mis pour germer et la vitesse d'allongement, ni entre la date de germination d'une graine et la vitesse d'allongement. Pour l'expérience de la SNES, il n'y a pas de corrélation entre la vitesse d'imbibition et les temps mis pour germer ; par ailleurs, la vitesse d'imbibition est positivement corrélée à la vitesse d'allongement, mais cette corrélation reste faible. Enfin, la vitesse d'allongement se révèle négativement corrélée aux temps de germination (ce qui signifie que la vitesse de germination et la vitesse d'allongement sont positivement corrélées). Cette corrélation semble indiquer un lien entre la capacité à germer et celle à croître rapidement alors même que ces deux variables ont été mesurées de façon à bien séparer les étapes de germination et de croissance. Ce type de résultats, établis aussi de façon à séparer les deux étapes, a déjà été observé (Dürr *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les indications de corrélations plus ou moins marquées entre ces types de variables, relevées sans la bibliographie (cf. Introduction § 1.1).

2.5.4. Résultats des analyses QTL

Les tableaux 3.10 et 3.11 présentent les résultats de la détection de QTL issus des données de phénotypage à l'UR LEG et à la SNES, respectivement. Pour chacun des caractères phénotypés pour lesquels des QTL ont été identifiés, l'effet génétique est estimé par rapport aux allèles du parent DZA315.16. Quand cet effet est positif, cela veut dire que les allèles du parent DZA315.16 augmente la valeur du caractère et inversement. Nous présenterons dans un premier temps les analyses QTL issues des données de phénotypage réalisé à l'UR LEG, puis celles obtenues par les données acquises du banc de germination à la SNES.

Identification des QTL à partir de l'expérience réalisée à l'UR LEG

Parmi les caractéristiques phénotypées à l'UR LEG, des QTL associés aux variations de la masse de la semence (MS), du temps pour atteindre 90% de germination (T90) et du taux de plantules levées 7 jours après semis (LevT2) ont été détectés (Tableaux 3.10 a et b ; Figure 3.9).

Deux QTL de MS ont été identifiés sur les chromosomes 1 et 7. Le QTL du chromosome 1 est détecté par les deux méthodes d'analyses (SIM et CIM). Les deux QTL ont des effets additifs opposés : les allèles de DZA315.16 induisent un effet positif en augmentant la MS (QTL du chromosome 1), soit un effet négatif en diminuant la MS (QTL du chromosome 7).

Les données de phénotypage relatifs aux temps de germination ont permis d'identifier des QTL du T90. Trois QTL contribuent à la variation ce caractère : ils sont localisés sur les chromosomes 4, 5 et 7. Pour ces 3 QTL, on observe des effets alléliques contrastés. Pour les QTL des chromosomes 4 et 7, les allèles de DZA315.16 diminuent le T90 alors que pour le QTL du chromosome 5, ils l'augmentent de 2.73 heures (effet additif positif). Ce dernier QTL est détecté par les deux méthodes avec un LOD

(a) QTL détectés par SIM	Chrom	Position (cM)	Marqueur gauche	IC (cM)	LOD score	R ² (%)	Effet additif	Valeur seuil de détection du QTL
Caractéristique semence								
MS	1	56	MTE62	50-68	2.69	10.8	0.155	2.65
Germination								
T90	4	44	MTE29	32-50	2.69	10.7	-2.018	2.68
	5	82	MTE37	74-90	3.92	18.4	2.732	
Levée								
LevT2	4	48	Mtic484	38-58	2.7	10.9	0.877	2.59

(b) QTL détectés par CIM	Chrom	Position (cM)	Marqueur gauche	IC (cM)	LOD score	R ² (%)	Effet additif	Valeur seuil de détection du QTL
Caractéristique semence								
MS	1	56	MTE62	50-60	2.84	11.4	0.145	2.65
	7	48	Mtic432	42-52	2.67	10.8	-0.149	
Germination								
T90	5	82	MTE37	74-86	2.89	19.9	2.807	2.68
	7	62	MTE125	58-66	2.90	20.6	-3.035	
Levée								
LevT2	4	48	Mtic484	40-50	3.24	12.9	0.857	2.59

Tableaux 3.10 : Résultats de la détection QTL issus des résultats de l'essai mené à l'UR LEG par (a) SIM et par (b) CIM.

Les co-facteurs déclarés ont été déclarés manuellement (4 cofacteurs pour MS, 4 cofacteurs pour T90 et 2 cofacteurs pour LevT2).

Chrom : chromosome

IC : Intervalle de Confiance

R² : Variabilité phénotypique

plus fort par SIM (Tableau 3.10). Enfin, un QTL impliqué dans la variation du taux de plantules levées observé 7 jours après semis (LevT2) a été identifié sur le chromosome 4. Les allèles de DZA315.16 ont un effet positif sur ce caractère en augmentant le taux à cette date.

A l'issue de ces résultats d'identification de QTL, plusieurs observations peuvent être réalisées. Il n'y a pas de co-localisation (i.e. lorsque les intervalles de confiance des QTL se chevauchent) entre les QTL contrôlant la MS et les temps de germination (Figure 3.9 ; Tableau 3.9 a ; Tableaux 3.10 a et b). Les QTL contrôlant le taux de plantules levées et le T90 sont dans la même région chromosomique. Le faible nombre ou l'absence de QTL pour certains caractères mesurés peut être expliqué en partie par le nombre restreint de données phénotypées lors de l'expérience menée à l'UR LEG et qui atténue le pouvoir de détection des QTL.

Identification des QTL à partir de l'expérience réalisée à la SNES

Sur le lot de semences utilisé à la SNES, des QTL impliqués dans les variations de la masse de la semence (MS), le pourcentage d'imbibition (%S), le temps pour atteindre 20, 50, 70% de germination et le temps moyen de germination (TMG) et la vitesse d'allongement (Vall) ont été détectés (Tableaux 3.11 a et b ; Figure 3.9).

Quatre QTL de MS ont été identifiés : sur les chromosomes 1, 5 et 7 par les deux méthodes et sur le chromosome 8 par CIM uniquement. C'est le QTL localisé sur le chromosome 7 qui a le LOD le plus élevé (7.58) et qui explique la part de variation observée la plus importante (18.5%). Ce locus a un effet génétique négatif sur la masse (diminution de 0.178 mg) contrairement aux 3 autres locus.

Un QTL impliqué dans la variation de %S a été identifié sur le chromosome 4, uniquement par CIM. Ce QTL explique environ 8% de la variation phénotypique. L'effet additif est négatif ce qui indique que les allèles de DZA315.16 induisent une diminution du %S.

Concernant la phase de germination, deux QTL ont été détectés sur le chromosome 5. Le premier est impliqué dans la variation du T20, T50 et TMG, il est localisé dans l'IC compris entre 0 et 14 cM. Le second QTL identifié plus bas sur le même chromosome, contrôle le T70. Ces deux QTL impliqués dans la variation des temps de germination sont détectés par les deux méthodes avec des LOD et des parts de variation observée plus élevés par CIM pour T20, T50 et TMG mais plus faibles par CIM pour T70. Pour ces deux QTL, les IC sont égaux ou plus restreints par CIM. Les valeurs de LOD et de part de variation phénotypique sont les plus élevées pour T20 et T50. L'effet des allèles aux locus marqueurs augmente le temps de germination. Les allèles de DZA315.16 à ces locus induisent une diminution de la vitesse de germination. Sur le chromosome 3, un QTL contrôlant la vitesse d'allongement a été détecté par CIM. Il explique 8.5% de la variation phénotypique et augmente la valeur du caractère.

(a) QTL détectés par SIM	Chrom	Position (cM)	Marqueur gauche	IC (cM)	LOD score	R ² (%)	Effet additif	Valeur seuil de détection du QTL
Caractéristique semence								
MS	1	52	MTE62	38-60	2.58	6.6	0.118	2.64
	5	2	MTE30	0-14	2.64	7	0.122	
	7	52	Mtic432	48-58	5.47	13.7	-0.172	
Germination								
T20	5	8	MTE31	0-14	3.86	9.9	0.406	2.74
T50	5	8	MTE31	0-14	4.04	10.3	0.576	2.56
T70	5	42	MTE34	28-60	3.11	8.0	0.824	2.51
TMG	5	8	MTE31	0-14	3.24	8.4	0.550	2.55

(b) QTL détectés par CIM	Chrom	Position (cM)	Marqueur gauche	IC (cM)	LOD score	R ² (%)	Effet additif	Valeur seuil de détection du QTL
Caractéristique semence								
MS	1	52	MTE62	50-60	3.35	8.5	0.111	2.64
	5	2	MTE30	0-8	3.03	8	0.109	
	7	52	Mtic432	48-58	7.58	18.5	-0.178	
	8	70	MTE56	66-76	3.39	8.6	0.112	
Imbibition								
% Surface (0-8h)	4	44	MTE29	34-48	3.10	7.9	-6.311	2.56
Germination								
T20	5	8	MTE31	0-12	4.88	12.3	0.436	2.74
T50	5	8	MTE31	0-14	4.57	11.6	0.591	2.56
T70	5	48	MTE35	36-52	2.68	6.9	0.701	2.51
TMG	5	4	MTE30	0-14	3.63	9.5	0.574	2.55
Début d'allongement								
Vall (entre 4 et 10h après semis, mm.h ⁻¹)	3	54	MTE20	48-58	3.28	8.5	0.028	2.59

Tableaux 3.11: Résultats de la détection QTL issus des résultats de l'essai réalisé à la SNES par (a) SIM et (b) CIM.

Les co-facteurs déclarés ont été sélectionnés par l'analyse (7 cofacteurs pour MS, 3 cofacteurs pour S%, 4 cofacteurs pour T20, 3 cofacteurs pour T50, 4 cofacteurs pour T70, 3 cofacteurs pour TMG et 7 cofacteurs pour Vall).

Chrom : chromosome

IC : Intervalle de Confiance

R² : Variabilité phénotypique

En considérant l'ensemble des QTL identifiés, bien qu'il existe une corrélation entre les temps de germination et la vitesse d'allongement, les QTL détectés pour ces différents caractères ne co-localisent pas (Tableau 3.9 b ; Tableaux 3.11 a et b ; Figure 3.9). Ils sont détectés sur les chromosomes 5 et 3 pour les vitesses de germination et d'allongement, respectivement. Le QTL de MS situé sur le chromosome 5 co-localise avec un des QTL contrôlant le temps de germination (T20, T50 et TMG), bien qu'aucune corrélation n'ait été observée entre ces deux caractères.

Comparaison des QTL identifiés à partir des deux expériences

La synthèse des résultats issus des deux expériences nous conduit à un premier constat : davantage de QTL ont été identifiés pour l'essai à la SNES. Ceci s'explique par (1) un plus grand nombre de données phénotypiques (davantage de LR phénotypées) (2) une meilleure qualité de phénotypage, e.g. l'utilisation du banc de germination couplé à la prise et à l'analyse d'images automatisées a permis de détecter des QTL pour des caractères difficilement mesurables par phénotypage classique (caractéristiques d'imbibition et d'allongement précoce).

Pour les caractères mesurés communs aux deux expériences, les positions des QTL contrôlant la MS et les temps de germination peuvent être comparés. Les deux QTL impliqués dans la variation de la MS du lot de semences utilisé à l'UR LEG sont retrouvés parmi les 4 détectés à partir du lot de semences utilisé à la SNES. Ces QTL situés sur les chromosomes 1 et 7 ont les valeurs de LOD élevées et expliquent une grande part de la variation observée. Ces locus étant communs aux deux lots de semences caractérisés, ils sont probablement peu influencés par les conditions de production des semences : ce sont des QTL stables.

Pour l'analyse des temps de germination, la comparaison des deux expériences reste difficile en raison d'une très grande différence de conditions expérimentales. Ces différences peuvent expliquer que les QTL contrôlant les temps de germination ne sont pas dans les mêmes régions chromosomiques pour les deux essais. De plus, ce ne sont pas les mêmes temps de germination pour lesquels des QTL ont été détectés : 2 QTL contrôlant T20, T50 et TMG, d'une part, et T70 d'autre part pour le phénotypage réalisé à la SNES et 3 QTL impliqués dans la variation du T90 pour le phénotypage à l'UR LEG. Pour cette expérience, le fait de n'avoir détecté des QTL que pour un temps de germination tardif (T90) peut s'expliquer par la vernalisation imposée. Celle-ci a pu homogénéiser le début de la germination, atténuant ainsi les différences entre LR et empêchant la détection des QTL contrôlant les temps précoces de germination.

Enfin, en regroupant l'ensemble des caractères mesurés au cours des deux expériences, on trouve une région du chromosome 4 où co-localisent trois QTL contrôlant : la vitesse d'imbibition (%S) (SNES), le T90 et le taux de levée (LevT2) (UR LEG). Il reste cependant difficile de faire des hypothèses pour expliquer ces co-localisations de QTL puisque les différents caractères ont été phénotypés dans des conditions expérimentales différentes.

3. Discussion et perspectives

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis d'apporter des connaissances sur le déterminisme génétique des caractères décrivant les phases de germination et de début de croissance. De tels résultats obtenus à l'issue de la démarche proposée dans la thèse, doivent contribuer *in fine* au développement de stratégies d'amélioration et de sélection de caractères importants à considérer lors de l'implantation d'une culture.

3.1. Bilan expérimental et méthodologique

Les mesures nécessaires à la caractérisation des étapes précédant la levée pour une analyse QTL sont difficiles à obtenir en raison d'un grand nombre de géotypes et de graines à caractériser simultanément mais aussi, de la courte période d'acquisition de données de type dynamique (vitesses d'imbibition, de germination, d'allongement). Pour l'expérience menée à l'UR LEG, les difficultés de phénotypage peuvent expliquer dans une certaine mesure, l'absence de détection de QTL contrôlant certains caractères. L'expérience réalisée à la SNES nous a permis de tester à grande échelle des acquisitions de mesures, en combinant des analyses d'images, l'automatisation de leur traitement et l'exploitation des résultats bruts dans un système matriciel synthétique. La qualité de mesures offerte par le phénotypage associant le banc de germination et les caméras a permis l'identification de QTL.

Notre étude contribue à démontrer (1) l'intérêt d'utiliser cet outil pour phénotyper précisément à grande échelle (fréquence et simultanéité d'acquisition des valeurs pour de nombreux géotypes) et (2) la possibilité d'acquérir des caractères difficilement mesurables par un phénotypage classique (e.g. surface de la semence, vitesse d'imbibition, vitesse d'allongement précoce). Plusieurs aspects expérimentaux restent à améliorer, notamment le délai du semis (afin d'acquérir une image initiale correspondant le plus possible à celle du moment du semis) et l'homogénéité de teneur en eau le long de la table de Jacobsen. Enfin, compte tenu de la durée de l'expérience (12 semaines), il pourrait être envisagé d'augmenter la capacité de semis en ayant un dispositif en série incluant plusieurs bancs de germination. Cette méthode de phénotypage haut débit a été utilisée pour la première fois pour une étude de déterminisme génétique au cours des étapes de germination et de début de croissance.

De plus pour cette expérience, nous avons disposé d'une quantité importante de semences. Nous avons donc pu mettre en place un dispositif expérimental valorisant ces avantages matériels permettant de mieux dégager l'effet LR. Nous avons cependant dû faire face à certaines contraintes expérimentales, liées au matériel disponible (un seul banc), au nombre de LR à phénotyper simultanément et à la disposition sous chaque caméra de groupes de LR germant de façon homogène.

Les analyses de variance ont révélé un effet bloc pour les temps de germination notamment (Tableau 3.6). Cet effet bloc peut être dû à une réelle hétérogénéité entre les 12 semaines (variations environnementales) mais peut provenir aussi d'un effet « groupe de LR » (Tableau 3.2).

Les LR présentes dans les blocs 6 et 7 germent plus rapidement. Pour ces blocs, les températures enregistrées ont été les plus élevées (Annexe 3.2). Pour les LR présentes dans ces blocs, la proportion d'allèles provenant de Jemalong au marqueur MTE31 (le plus proche du pic du QTL du T50) est plus importante (65%). Il est donc difficile de savoir si ces blocs se distinguent à cause des différences environnementales observées entre les semaines ou à la présence de certaines LR. La plus grande source de variation dans notre expérience est due une hétérogénéité le long du banc. Son effet a pu être mis en évidence par l'analyse des données observées sous les différentes caméras réparties le long du banc. L'identification de cet effet doit contribuer à améliorer le dispositif.

3.2. Intérêt de l'approche QTL pour l'étude des relations entre caractères et pour l'amélioration

La cartographie de QTL impliqués dans la variation de différents caractères permet d'accéder aux bases génétiques des corrélations. Outre l'apport d'informations sur les relations entre caractères, ce type d'étude est nécessaire dans une optique d'amélioration génétique afin de mieux choisir les marqueurs à utiliser pour aider la sélection.

Lorsque deux QTL co-localisent, il peut s'agir d'un unique QTL à effet pléiotrope, s'il y a des relations causales entre les caractères, mais aussi de deux QTL génétiquement liés. Si l'allèle au marqueur du QTL considéré entraîne l'amélioration d'un des deux caractères, il peut aussi être défavorable pour l'autre caractère. Si un allèle est favorable pour les deux caractères, cette région présente alors un intérêt pour l'amélioration des deux caractères. Afin d'optimiser la sélection assistée par marqueurs, il faut ainsi privilégier les allèles favorables des QTL communs à plusieurs caractères ou cumuler ceux de QTL isolés.

Plusieurs travaux décrits dans la littérature soulignent l'importance de considérer l'ensemble des co-localisations de QTL associés à différentes caractéristiques que l'on souhaite ou non réunir dans une optique d'amélioration. C'est le cas chez la tomate où plusieurs QTL impliqués dans la variation de la masse et de la taille du fruit et des caractéristiques organoleptiques telles que la douceur de goût ont été identifiés (Causse *et al.*, 2002). Dans cette étude, certains QTL co-localisent. Une des zones de co-localisation de QTL s'avère intéressante car les allèles provenant d'un des parents augmentent la masse du fruit et le goût sucré et diminuent simultanément l'acidité et la texture granuleuse. Inversement, chez l'orge, un QTL contrôlant à la fois la teneur relative en eau et des paramètres de croissance végétative sous déficit hydrique présente des effets opposés sur les deux types de caractères (Teulat *et al.*, 1997). Ce QTL ne doit donc pas être utilisé en sélection. Dans notre étude, des QTL impliqués dans la variation du T90 et du taux de plantules levées (levT2) sont co-localisés alors qu'il n'y a pas de corrélation significative entre ces deux caractères (Tableau 3.9 a ; Figure 3.9). Les effets de ces QTL sont opposés : l'un a pour effet d'augmenter le taux de levées alors que l'autre a pour effet de diminuer le temps pour atteindre 90% de germination, c'est-à-dire d'augmenter la vitesse de germination. De la même façon, sur le chromosome 5, le QTL impliqué dans les variations de la masse

de la semence et ceux contrôlant certains temps de germination (T20, T50, TMG) co-localisent alors que les deux types de caractères ne sont pas corrélés (Tableau 3.9 b ; Figure 3.9). Leurs effets respectifs sont positifs si bien que l'augmentation de la masse de la semence est associée à l'augmentation des temps pour germer.

Concernant la masse de la semence, trois QTL isolés ont également été identifiés (Tableau 3.9 b ; Figure 3.9). La présence de ces QTL isolés explique largement l'absence de corrélation entre la masse de la semence et les temps de germination. En l'absence de corrélation, pour les zones de co-localisation de QTL identifiées, même si des relations causales sont possibles entre les caractères, il faudrait réaliser une cartographie fine de ces régions pour conclure quant à l'existence d'un seul QTL ou de deux QTL proches. S'il s'agit de QTL distincts, l'expression de caractères est alors possible à dissocier.

Enfin, des corrélations significatives entre la vitesse d'allongement précoce (Vall) et les temps de germination (T_i et TMG), mesurés à la SNES, existent mais nous n'avons pas détecté de QTL communs (même observation pour la vitesse d'imbibition et vitesse d'allongement ; Tableau 3.9 b, Figure 3.9). Dans ce cas précis, les corrélations sont significatives mais demeurent faibles ($r < |0.28|$; Tableau 3.9), ce qui peut expliquer que les QTL détectés soient spécifiques de chacun des caractères. Par contre, nous avons mis en évidence de fortes corrélations entre les différents temps de germination (T_i et TMG) et les QTL associés aux T20, T50 et TMG sont co-localisés.

Dans ce cas, il s'agit vraisemblablement du même QTL car la corrélation entre ces variables est très forte et les pics, très voisins (Tableaux 3.12 ; Figure 3.9). Par ailleurs, bien que le T70 soit fortement corrélé aux autres temps de germination, le QTL impliqué dans sa variation ne co-localise pas avec les autres QTL. Cette observation laisse supposer que ce QTL est associé à un comportement spécifique en fin de cinétique de germination.

3.3. Comparaison des QTL identifiés dans notre étude avec des QTL identifiés chez *Medicago truncatula* et chez les Légumineuses cultivées

Le regroupement de données issues d'analyses QTL menées sur différentes populations de LR chez *M.tr.* peut apporter des informations complémentaires sur la pertinence et la stabilité des régions chromosomiques que nous avons identifiées et sur la variabilité des comportements observés à 20°C, au cours des phases précoces. Dans notre étude, seuls des QTL contrôlant la masse de la graine sont retrouvés pour les deux lots de graines utilisés. Ces QTL sont stables. Pour les autres caractères mesurés, il n'est pas possible de comparer les positions des QTL identifiés car aucune autre analyse QTL relative aux phases de germination et d'allongement n'a été réalisée jusqu'à présent.

En début de chapitre, nous avons présenté les principales différences génotypiques observées qui ont conduit au choix de certaines populations de LR de *M.tr.* ainsi que les analyses QTL actuellement menées au sein de notre équipe. A l'issue de ces travaux, nous avons réalisé des comparaisons de QTL entre populations de LR en particulier pour les réponses aux températures extrêmes (article en cours

de rédaction). Cette démarche a pour objectif de regrouper les résultats relatifs aux mêmes étapes (i.e. germination, début de croissance) au cours desquelles des facteurs environnementaux différents ont été imposés. Une synthèse sur les zones spécifiques de réponse à un facteur donné, lors d'une donnée étape, sera réalisée. Les co-localisations des QTL identifiés permettront de mieux caractériser le comportement de l'espèce au cours des phases précoces en intégrant les réponses aux différents stress.

Il peut être également intéressant de comparer les QTL que nous avons identifiés avec des QTL associés à des caractères phénotypés lors de phases plus avancées du cycle de développement dans différentes populations de LR. Plusieurs analyses QTL sont actuellement menées. Elles visent à identifier les bases moléculaires de comportements observés en réponse à d'autres facteurs abiotiques (photopériode, Pierre *et al.*, 2008 ; apport en azote, non publié ; acclimatation au froid en phase végétative, Avia, 2008) ou à des facteurs biotiques (anthracnose et pourriture grise, Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008).

Les caractères étudiés dans notre travail peuvent être influencés par les caractéristiques des lots de semences, qui découle de l'histoire de la plante porte graines. La comparaison des positions des QTL identifiés dans notre travail avec celles de QTL pouvant influencer la qualité des semences (date de floraison, répartition de la biomasse et de capacité des plantes porte graines à prélever l'azote) peut donc contribuer à mieux comprendre l'origine de la variabilité des comportements avant la levée.

De travaux visant à évaluer les effets de la photopériode sur la date de floraison et à décrire l'architecture de la plante ont été effectués sur plusieurs populations de LR (Pierre *et al.*, 2008). Ils ont permis d'identifier plusieurs QTL associés à la date de floraison, à des caractères architecturaux (vitesse d'allongement et longueur des ramifications...). Dans la population LR4, les QTL de floraison sont sur les chromosomes 1, 5, 7 et 8. Leur IC se superposent ou se chevauchent avec ceux de QTL contrôlant la masse de la semence, identifiés dans nos travaux, suggérant que la précocité de floraison, corrélée à la durée de remplissage des graines, pourrait avoir un effet positif sur la masse de ces graines. Il a d'ailleurs été observé sur plusieurs sous espèces du genre *Medicago* (*Medicago rigidula*, *minima*, *radiata* et *blancheana*) que les graines des gousses produites les plus tardivement avaient une masse moins importante que celles issues de gousses produites au début du cycle reproducteur (Cocks, 1990).

La comparaison des positions de QTL peut être étendue à d'autres espèces de Légumineuses cultivées, plus ou moins proche d'un point de vue phylogénétique. Cette cartographie comparée de QTL suggère des mécanismes communs aux espèces considérées, pour les mêmes caractères. Cependant, à notre connaissance, l'étude du déterminisme génétique de variables caractérisant la germination et le début de croissance en réponse à des facteurs environnementaux majeurs, n'a pas été réalisée chez d'autres Légumineuses. La plupart des travaux d'analyse du déterminisme chez les Légumineuses cherchent à identifier les bases génétiques liées à des résistances à des pathogènes, chez

le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (*Sclerotinia sclerotiorum*, Kolkman et Kelly, 2003 ; *Thrips palmi* Karny, Frei *et al.*, 2005), chez le pois (*Aphanomyces euteiches*, Pilet-Nayel *et al.*, 2005) et chez le soja (Meloidogyne, Bo-Keun *et al.*, 2004). D'autres analyses QTL concernant des caractères évaluant la qualité biochimique des semences i.e. teneurs en protéines et éléments minéraux (*Pisum sativum*, Irzykowska et Wolko, 2004 ; *Pisum sativum*, McPhee et Grusak., 2006 ; *Lotus japonicus*, Cvitanich *et al.*, 2007) et des critères de production i.e. rendement en graines, index de récolte (*Pisum sativum*, Timmerman-Vaughan *et al.*, 2005 ; *Trifolium repens*, Barrett *et al.*, 2005 ; *Trifolium pratense*, Herrmann *et al.*, 2006) ont aussi été réalisées. Sur des caractères mesurés au cours du cycle végétatif, des QTL contrôlant la date de floraison ainsi que des caractères de morphologie foliaire ont aussi été identifiés chez le soja (Yamanaka *et al.*, 2001).

Cependant, grâce à la syntenie entre les génomes de Légumineuses, les études de déterminisme que nous avons entreprises chez la Légumineuse modèle *M.tr.* doivent permettre de mieux cibler les régions du génome à analyser prioritairement sur les Légumineuses cultivées. La recherche et l'analyse de l'implication de gènes orthologues dans des réponses comparables entre espèces peut être alors réalisée. Des travaux de caractérisation de génotypes de pois au cours de la germination et de la croissance hétérotrophe à l'aide du cadre d'analyses de SIMPLE sont déjà engagés (Kolopp, 2008). Ils devraient aboutir à des analyses du déterminisme génétique de variables cibles en fonction de ce qui a été observé chez *M.tr.*.

3.4. Recherche de bases génétiques fonctionnelles

A l'issue de l'analyse QTL, plusieurs perspectives permettant de mieux caractériser les zones du génome impliquées dans la variation de caractères décrivant la germination et l'allongement en réponse à la température peuvent être envisagées.

Une première démarche avec *a priori* consiste à rechercher les déterminants moléculaires sous jacents par identification *in silico* de gènes candidats dans l'intervalle de confiance (IC) des QTL. Il s'agit d'exploiter les ressources disponibles chez *M.tr.* (carte physique du génome et bases de données). La carte physique est constituée d'un assemblage de BACs ordonnés en contigs le long des chromosomes. Ces BACs sont séquencés et pour certains gènes présents dans ces BACs, une fonction a été attribuée sur la base d'homologie de séquences.

Comme la carte LR4 comporte des marqueurs MTE ancrés dans la carte physique, il est possible d'identifier les gènes présents dans l'IC des QTL identifiés. On considérera que ces gènes inventoriés sont des gènes candidats quand la fonction décrite du gène laisse supposer une implication dans la variation du caractère observé, d'après des hypothèses sur des mécanismes ou des voies métaboliques impliqués et/ou des éléments bibliographiques.

Dans le cadre de notre analyse sur LR4, nous avons commencé la recherche *in silico* de gènes candidats situés dans l'IC des QTL contrôlant les temps de germination à 20°C.

Cette première analyse, bien que prospective, nous a d'ores et déjà permis d'identifier quelques gènes potentiellement intéressants. Les QTL identifiés peuvent soit correspondre à des locus contrôlant les temps de germination indépendamment de la température, ou être impliqués dans des réponses spécifiques à cette température supra-optimale pour *M.tr.*.

Dans l'IC du QTL contrôlant le T70 situé sur le chromosome 5 proche de MTE35, on trouve un gène codant une germin-like protein (GLP). Plusieurs locus de gènes codant des GLP sont présents sur le génome de *M.tr.*. Des travaux sur le haricot ont montré pour la première fois l'accumulation spécifique d'une GLP (PvGLP1) dans l'axe embryonnaire durant la germination et plus précisément avant la percée de la radicule (Aubry *et al.*, 2003). Cette protéine semble être associée à des stades jeunes de croissance de la radicule.

Pour le T90, on trouve dans les IC des QTL identifiés sur les chromosomes 5 et 7, des gènes codant des facteurs de transcription à domaine APETALA2 et bZIP, respectivement. Ils correspondent aux gènes orthologues *abi4* et *abi5* d'*Arabidopsis thaliana*. Les mutants *aba insensitive (abi)* présentent une insensibilité à l'acide abscissique (ABA) inhibant son action dans les graines (Koornneef *et al.*, 1984 ; Finkelstein et Zeveaart, 1994). Il a été montré par ailleurs que l'ABA intervient dans l'inhibition de la germination à des températures élevées (Tamura *et al.*, 2006 ; Toh *et al.*, 2008). La présence de ces deux gènes dans les IC de QTL contrôlant les temps de germination à une température supra-optimale pour *M.tr.* conforte leur statut de gènes potentiellement à l'origine des comportements observés. La recherche de gènes candidats *in silico* sur LR4 sera poursuivie.

De la même façon, l'analyse réalisée sur LR5 a conduit à l'identification *in silico* de plusieurs gènes candidats pouvant expliquer les variations observées de longueur finale et largeur à basse température. Parmi ceux-ci, un gène codant une α -expansine, protéine intervenant dans l'extension cellulaire par l'action sur l'allongement des parois (Sampedro et Cosgrove, 2005) a été trouvé dans l'IC d'un QTL contrôlant la longueur maximal de l'hypocotyle.

Une deuxième démarche sans *a priori* serait de combiner les résultats de l'analyse QTL à des résultats de génomique fonctionnelle. Par exemple, en comparant le transcriptome à basse température des hypocotyles en croissance des génotypes parents de LR5, il devrait être possible d'identifier les gènes présents dans l'IC des QTL contrôlant les longueurs d'hypocotyle, différemment exprimés entre les deux génotypes. Cette étude sera prochainement réalisée et devrait apporter des éléments nouveaux sur les gènes différemment exprimés entre les génotypes parentaux, spécifiquement à basse température. Cependant pour identifier le gène à l'origine de la variation d'un caractère, il faut réaliser une cartographie fine de la région chromosomique impliquée. Cette méthode requiert la construction et l'analyse d'une importante population de lignées quasi isogéniques, i.e. dont les génotypes ne diffèrent que pour un QTL identifié (NIL, Near Inbred Lines).

3.5. Intégration de paramètres génétiques dans un modèle écophysiologique

Une analyse QTL fournit des informations sur l'effet génétique de chaque QTL et sur les allèles générant ces effets. L'intérêt de ces informations est de pouvoir prédire l'effet d'un allèle sur un caractère. Cependant, les caractères quantitatifs étant dépendants de l'environnement, cette prédiction devra être menée dans des conditions environnementales similaires à celles qui ont permis la détection de ces QTL.

L'intérêt d'utiliser un modèle écophysiologique est de permettre la formalisation mathématique des comportements d'un génotype *via* des paramètres dont les valeurs calculées sont indépendantes des facteurs environnementaux. Les modèles écophysiologiques peuvent inclure des informations génétiques *via* des paramètres dépendants du génotype. Les paramètres des modèles écophysiologiques sont des caractères quantitatifs pour lesquels on peut rechercher des QTL. Le modèle écophysiologique peut alors permettre de prédire les comportements de ce génotype dans un panel de conditions environnementales à partir de ses paramètres mesurés ou calculés.

Le modèle écophysiologique et les résultats d'analyses QTL des paramètres peuvent être combinés en substituant la valeur des paramètres du modèle analysés par la somme des effets des QTL. On peut alors simuler les comportements de génotypes portant diverses combinaisons alléliques ; les valeurs de paramètres ainsi déterminées servant aux prévisions au lieu de leurs valeurs mesurées. Ces modèles combinés sont parfois appelés modèles QTL.

Ce type d'approche, qu'il s'agirait de développer à la suite de nos travaux, a déjà fait l'objet d'avancées sur plusieurs espèces (haricot, White et Hoogenbom, 1996 ; maïs, Reymond *et al.*, 2003 ; orge, Yin *et al.*, 2003 ; seigle, Chapman *et al.*, 2003 ; pêcher, Quilot *et al.*, 2005b ; soja, Messina *et al.*, 2006). Les mesures de phénotypage permettant l'analyse QTL correspondent soit à des caractères qui sont directement les paramètres du modèle écophysiologique (Quilot *et al.*, 2005b), soit à des caractères permettant d'estimer la valeur du paramètre du modèle (Messina *et al.*, 2006).

Le calcul de la valeur des paramètres est réalisé par régression linéaire multiple, en tenant compte de l'information génétique aux différents loci contrôlant ces paramètres. Dans la fonction permettant de décomposer la valeur du paramètre en effets génétiques, une valeur 0 ou 1 est affectée à chaque loci, selon sa forme allélique (e.g. provenance parentale ou bien effets : dominant ou récessif). Une valeur par défaut (μ) est attribuée au paramètre : elle correspond à la valeur du paramètre quand le génotype ne possède que les allèles dont on a affecté la valeur 0.

La forme de la fonction peut s'écrire de la façon suivante (d'après Quilot *et al.*, 2005b) :

$$X_i = \mu + \sum_{n=1}^N a_n \times G_{i,n} + \sum_{m=1}^M e_m \times G_{i,m}$$

Où X_i est la valeur estimée pour un individu i du paramètre X pour lequel N QTL et M interactions épistatiques ont été détectés, a_n correspond à l'effet additif du QTL n , e_m correspond à l'effet de l'interaction épistatique m , $G_{i,n}$ et $G_{i,m}$ sont les valeurs attribués aux loci (prenant les valeurs 0 ou 1 selon la forme allélique présente pour l'individu i) respectivement pour les QTL additifs et épistatiques. La valeur de paramètre ainsi déterminée est alors utilisée dans le modèle écophysiologique pour réaliser les prédictions (Quilot *et al.*, 2005b).

Une perspective à moyen terme serait de rechercher des QTL contrôlant des paramètres d'entrée du modèle SIMPLE. Nous pourrions alors intégrer de la même façon l'information génétique dans le modèle écophysiologique afin de prédire la germination et/ou l'allongement hétérotrophe des génotypes dans une gamme d'environnements. Cette perspective n'est envisageable qu'en développant des moyens de phénotypage haut débit adaptés aux mesures nécessaires pour l'acquisition des paramètres.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux présentés avaient pour objectif de mettre en oeuvre une démarche originale. Il s'agissait :

- d'adopter une espèce utilisée comme modèle dans les études menées en génomique afin de la caractériser avec des variables utilisées en agronomie et en écophysiologie pour analyser le fonctionnement d'une plante au cours des premières étapes de son cycle avant le passage à l'autotrophie ;
- de réaliser cette caractérisation en déterminant les valeurs des paramètres d'un modèle de prévision des levées. Ce modèle devait fournir une liste de mesures à réaliser, pertinentes en première approche pour prévoir la levée en conditions de semis au champ ;
- de mener cette caractérisation sur un ensemble de génotypes choisis de la manière la plus pertinente possible, compte-tenu des connaissances disponibles sur leurs caractéristiques, et du nombre limité de génotypes susceptibles d'être étudiés, au moins pour cette première approche ;
- d'utiliser les valeurs mesurées des paramètres pour simuler l'ampleur des effets de la diversité génétique mesurée sur cette espèce modèle. Cela correspondait à la seconde fonction assignée à l'utilisation du modèle de levée ;
- d'en déduire les caractères et les populations en ségrégation à étudier pour analyser le déterminisme génétique de caractères pouvant contribuer à l'amélioration des levées ;
- au bilan, de constituer un jeu de valeurs de références sur cette espèce et des pistes d'analyse à mener pour faire progresser les démarches d'amélioration des caractères menant à l'implantation d'une culture.

Nous allons revenir sur ces différents points afin de dresser un bilan à l'issue de l'ensemble des travaux présentés.

***Medicago truncatula*, une espèce modèle pour l'étude des étapes menant à l'implantation d'une culture ?**

Medicago truncatula est une des espèces modèles choisies pour le séquençage du génome d'une Légumineuse. Les raisons des nombreux travaux menés sur les Légumineuses résident en premier lieu dans la compréhension des mécanismes de la fixation symbiotique de l'azote et plus généralement du dialogue hôte-symbionte et hôte-pathogène. Un autre intérêt pour l'étude de mécanismes chez les Légumineuses réside dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'accumulation des protéines de réserve lors du remplissage de la graine.

Groupe	Espèce	Germination			Croissance hétérotrophe		
		T_b (°C)	Ψ_b (MPa)	STT 80% (°Cj)	T_b (°C)	STT 50 mm (°Cj)	L_{elon} (mm)
Dicotylédone							
Galegoïdes	Pois	-1.0	-1.7	30-45	3.5	50	150
Phaseaolides	Haricot	7-8	-1.7 à -2.5	12-20	7-10	50	250 - 300
	Betterave	3.5	-1.9	40	3.5	90	70-80
	Carotte	3.5	nd	45	nd	95	70-80
	Moutarde	3.2	-1.0	15	nd	65	150
	Colza	5-6	-1.2	20-25	nd		200-230
Monocotylédone							
	Blé	0-2	-2.9	45	nd	95	70-80
	Maïs	8	-1.6	35	nd	65	150
	Riz	13-15	nd	35	nd	nd	nd

Tableau C.1: Valeurs des paramètres décrivant la germination et la croissance hétérotrophe d'espèces cultivées.

Ces données ont été établies à partir de différentes sources, sans qu'elles soient toujours disponibles sous cette forme initialement (pois, rapport Kollopp, 2008 ; haricot, Moreau-Valancogne *et al.*, 2007; betterave, Dürr et Boiffin, 1995 ; carotte, Tamet *et al.*, 1996 ; moutarde, Dorsainvil *et al.*, 2005 ; colza, travaux Front IV SNES ; blé, Bouaziz et Bruckler 1989 a et b ; Bruckler 1983 ; Addae et Pearson, 1992 ; riz, Nishiyama, 1974).

Les recherches sur ces espèces ne sont donc pas *a priori* tournées vers la compréhension du déroulement des premières étapes de leur cycle, celles que nous avons étudiées, c'est-à-dire la germination et le début de croissance hétérotrophe. Pour aborder l'analyse du déterminisme génétique (structural et fonctionnel) du déroulement de ces étapes du cycle, il est nécessaire de choisir une espèce pour laquelle on dispose des outils requis. Mais, d'une manière générale, les études au niveau génétique et moléculaire concernant ces étapes du cycle restent souvent focalisées sur les mécanismes relatifs à la germination et à la dormance des semences. Par ailleurs, il est de pouvoir resituer les caractéristiques de *M.tr.* par rapport à celles d'autres espèces en particulier cultivées, afin de positionner l'intérêt et les limites de l'utilisation de cette espèce modèle, dans la perspective d'améliorer la compréhension et la maîtrise du déroulement de la levée.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le déroulement général des étapes décrites dans l'introduction conduisant à la germination, l'allongement des organes et la redistribution de réserves en terme de biomasse chez *M.tr.* sont similaires à celles décrites pour d'autres dicotylédones, y compris au-delà du groupe des Légumineuses. L'effet des températures extrêmes est le même : ralentissement jusqu'à l'arrêt du processus de germination ou d'allongement ; raccourcissement jusqu'à l'anormalité des organes des plantes soumises au froid. Cependant, *M.tr.* présente plusieurs particularités qu'il est important de récapituler.

Le calcul de somme de temps thermiques montre que la germination de *M.tr.* est très rapide et ne nécessite que quelques degrés-jours (Tableau C.1). Si certaines espèces présentent la même vitesse potentielle maximum, telles le haricot ou encore le colza et le lin, un grand nombre d'espèces requièrent quasiment le double de temps pour germer (par exemple le pois, le blé, la betterave), y compris en conditions optimales. Les mécanismes sous-jacents sont peut-être alors très différents selon les deux groupes considérés.

La germination de *M.tr.*, si elle est rapide, ne se produit que dans une gamme restreinte de température et de potentiel hydrique. La fenêtre propice à sa germination est limitée. Ce comportement est proche de celui considéré dans le cas des espèces sauvages et adventices comme une adaptation au maintien de l'espèce. On peut tenter de rapprocher les gammes de températures et de potentiels propices à la germination du groupe botanique d'appartenance de *M.tr.*. Elle appartient aux Galégoïdes (comme le pois), groupe de Légumineuses effectuant son cycle en saison froide par opposition au groupe des Phaséolides (auquel appartiennent haricot et soja), groupe aux origines tropicales. *M.tr.* se révèle apte à une germination et un début de croissance dans des conditions relativement froides et supporte moins bien des températures assez modérées, de l'ordre de 20°C. Ces caractéristiques doivent être considérées lorsqu'on s'intéresse au déterminisme génétique de la réponse à des températures extrêmes. Celui-ci est peut-être différent selon la gamme de températures extrêmes qui correspond à l'espèce étudiée (Nishiyama, 1972).

Enfin, il est important de savoir que la température de 20°C pourtant couramment utilisée pour les expérimentations en laboratoire, peut être supra-optimale pour certains génotypes ou lots de semences de *M.tr.* Il est nécessaire d'en tenir compte pour l'étude des effets d'autres facteurs environnementaux, par exemple la tolérance au stress hydrique.

M.tr. présente une forte sensibilité au stress hydrique, à l'instar du pois mais contrairement au haricot et au soja. Les caractéristiques de *M.tr.* relatives au potentiel hydrique, ne la rapprochent donc pas systématiquement d'un groupe de Légumineuses particulier. Cette germination très rapide est associée à une prise d'eau très importante sur un très court laps de temps et un gonflement très marqué de la graine. Une forte quantité d'eau localement disponible est donc nécessaire à sa germination. Des différences entre génotypes sont observées. Le génotype plus tolérant au stress hydrique présente une composition en sucres solubles (famille du raffinose) de sa semence particulière dont il faudrait analyser le rôle de façon plus approfondie. Mais une fois encore, ces caractéristiques de germination en fonction des conditions hydriques sont particulières et l'étude de leur déterminisme restera peut-être contingente des particularités de l'espèce.

La composition biochimique des semences de légumineuses est caractéristique (Bewley and Black, 1994). Les Légumineuses se distinguent en premier lieu par leurs très fortes teneurs en protéines de réserve. A notre échelle très globale de caractérisation (carbone et azote total), nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation entre composition en protéines totales des semences et déroulement des étapes étudiées. Les légumineuses se différencient aussi par leur composition en sucres solubles très différente des autres espèces (Kuo *et al.*, 1988). Les effets éventuels de différences importantes de composition en sucres solubles sur la tolérance au stress hydrique restent à éclairer.

M.tr. présente aussi une dormance embryonnaire assez prolongée et une forte inhibition tégumentaire conduisant à des taux élevés de graines dites dures, caractéristiques des légumineuses fourragères (genre *Medicago*, Taylor, 2005). Ce comportement est lui aussi proche de celui d'une espèce sauvage et/ou correspond à une stratégie de maintien d'un peuplement pérenne. Cette particularité peut être une véritable contrainte lorsqu'on cherche à caractériser des mécanismes relevant de la germination d'espèces cultivées pour lesquelles la domestication et la sélection ont largement éliminé ce comportement particulier. Ceci soulève la question du choix d'une espèce modèle non cultivée.

En résumé, il apparaît nécessaire de savoir resituer les caractéristiques de *M.tr.* concernant sa germination et son début de croissance parmi celles des autres espèces, puisque les travaux sur *M.tr.* sont menés dans la perspective de l'analyse du déterminisme génétique et la compréhension au niveau moléculaire du fonctionnement des plantes au cours de ces étapes. Il s'agit de la replacer par rapport au groupe botanique des Légumineuses, mais plus généralement, il est important de considérer l'impact des caractéristiques physiques et biochimiques de sa semence et de la plantule au-delà des seules Légumineuses. Ses caractéristiques particulières en terme d'exigences en températures et de conditions hydriques propices à sa germination doivent être gardés présents à l'esprit lors de l'étude

du déterminisme de différences de comportement face à des variations de ces facteurs. Enfin, la dormance naturelle importante de *M.tr* peut perturber différentes analyses menées sur les semences : effets des conditions de production de semences, aptitude à la conservation ou encore diversité génétique, lorsque ce n'est pas la dormance le caractère étudié. Cette même difficulté existe aussi dans le cas d'*Arabidopsis thaliana*.

La diversité génétique explorée : intérêt de la core-collection et de la diversité naturelle ?

Nous avons étudié un sous-ensemble de génotypes de la core-collection qui n'avait pas ou peu été caractérisé au cours des étapes de germination et de croissance hétérotrophe. Ce travail de caractérisation contribue à l'effort de phénotypage nécessaire sur les différentes collections disponibles, en particulier si l'on s'intéresse à l'amélioration de ces étapes du cycle. Il contribue ainsi à fournir les informations nécessaires à la communauté scientifique travaillant sur ces étapes et utilisatrice de cette espèce modèle.

Nous pouvons dresser en premier lieu un bilan sur l'ampleur de la diversité observée. La core collection de *M.tr.* a été constituée sur la base d'une analyse de la diversité caractérisée par des marqueurs moléculaires neutres, complétée par la prise en compte de critères de diversité de biotopes d'origine. Nous n'avions pratiquement pas d'indications sur une éventuelle diversité observée au cours de la germination et du début de croissance, en fonction des facteurs environnementaux étudiés. Une diversité d'origine géographique et de biotopes d'origine naturels assez importante existe dans les accessions de *M.tr.*. Nous avons tenté de choisir des génotypes si possible originaires de biotopes contrastés pour maximiser les chances d'observer de la variabilité au cours des étapes étudiées. Les génotypes retenus ont révélé des comportements contrastés au cours de ces étapes. Grâce à la diversité observée, il a été possible (1) d'examiner l'ampleur des effets de cette diversité sur ces étapes du cycle au travers d'expérimentations numériques, (2) d'orienter le choix de population de LR pertinentes quant à l'étude des bases génétiques contrôlant l'expression d'un caractère.

Il s'avère que la démarche retenue a permis de trouver une diversité que nous n'avions jusqu'alors pas trouvée parmi les espèces cultivées, ou bien qui avait été favorisée fortuitement par la sélection d'autres caractères d'intérêt (Dürr *et al.*, 2000 ; Botwright *et al.*, 2001). Disposer d'une core collection est un avantage car celle-ci permet de mettre en évidence de la diversité en étudiant un nombre limité de génotypes ciblés. Par ailleurs, la plus faible sélection exercée sur cette espèce comparée à d'autres espèces cultivées peut avoir favorisé le maintien d'une diversité importante.

Mises au point méthodologiques et développement d'outils de phénotypage : quelles variables mesurer et comment ?

Des mises au point de méthodes ont été nécessaires essentiellement pour permettre le phénotypage de plus grandes séries au laboratoire (génotypes, lots). L'estimation du potentiel hydrique de base ou encore du risque pour les plantes de rester bloquées sous une motte avait été jusqu'alors réalisée en faisant varier la teneur en eau de la terre ou en positionnant des mottes de terre sur le trajet des plantules. De telles méthodes présentent l'avantage d'être proches des conditions de semis en terre, mais restent très artisanales, et trop empirique dans le cas de la mesure des effets des obstacles mécaniques. Dans le cas du potentiel hydrique, pour passer à de plus grandes séries, nous avons travaillé sur papier buvard alimenté avec des solutions de PEG, méthode classiquement utilisée au laboratoire. La mesure des forces exercées permet d'obtenir une variable mesurée au laboratoire relative au franchissement des obstacles. Mais la mesure de cette variable ne se réalise pas encore sur de grandes séries et elle caractérise uniquement certains aspects du comportement des plantules face aux obstacles.

Pour aborder l'analyse du déterminisme génétique, nous avons dû phénotyper simultanément un grand nombre de lignées recombinantes. L'acquisition de mesures à caractère dynamique telles que vitesses de germination et d'allongement, est difficile à réaliser sur de telles étapes courtes et sur un grand nombre de semences simultanément. Cette difficulté est renforcée par la germination très rapide de *M.tr.*. L'utilisation d'un outil de phénotypage automatisé a facilité, voire rendu possible, l'acquisition de certaines données, tout en augmentant la précision des mesures. Cependant cet automate ne fonctionne à l'heure actuelle que dans une gamme limitée de conditions de milieu (potentiel non limitant et température dans la gamme 10 – 30°C). Par ailleurs, il n'est disponible qu'en un seul exemplaire et le temps requis pour le phénotypage d'une population reste très important. La caractérisation des génotypes et les résultats issus des simulations permettent de mieux cibler et prioriser les mesures de caractéristiques ayant un effet majeur sur la levée. Toutefois, on ne peut pas encore envisager de déterminer sur des ensembles de génotypes des valeurs de paramètres intégratifs tels que *Tbgerm* ou *Ψbgerm*. Actuellement, on se limite au phénotypage de quelques caractéristiques liées aux variations du paramètre (par exemple la cinétique de germination à 5°C et non la *Tbgerm*), même si le développement de moyens de phénotypage doit permettre à terme d'estimer de tels paramètres. La réalisation de ces mesures nécessite de renforcer la capacité de phénotypage des dispositifs existants. Le travail réalisé au cours de la thèse a contribué à démontrer l'intérêt de la mise au point de telles capacités de mesures, *via* des automates, sur les étapes de germination et de début de croissance.

L'utilisation d'un modèle de prévision des levées : intérêts et limites ?

Le modèle a été utilisé d'une manière originale, différente de ses utilisations antérieures qui consistait à évaluer les risques statistiques liés à des modifications des conditions de levée (date de semis, état structural du lit de semences, par exemple). Le modèle a été utilisé dans la présente étude pour évaluer l'ampleur des effets des différences entre génotypes sur la levée, et identifier les paramètres du génotype les plus importants à considérer dans des conditions de semis données. Les expérimentations sur le terrain sont souvent lourdes à réaliser et ne peuvent restituer des résultats que pour un nombre limité de dates et conditions de semis. La réalisation d'expérimentations numériques contribue à limiter les expérimentations sur le terrain et fournit des informations inaccessibles par ce type d'expérimentations. En simulant la germination et la levée à différentes dates de semis sur plusieurs années, on obtient non seulement une valeur moyenne représentative du comportement d'un génotype, mais aussi l'amplitude de ses variations à la germination et à la levée dans des conditions de milieu plus extrêmes, qu'il est possible d'identifier.

Dans des cas simples d'un effet majeur d'un paramètre dans une condition de semis donnée, on arrive au chiffrage prévisible d'un effet. Des situations plus complexes à interpréter dans lesquelles les effets de plusieurs paramètres interagissent peuvent se présenter. On peut alors aboutir à des résultats de levée initialement peu prévisibles (i.e. interaction entre la date de formation d'une croûte et la date d'arrivée à la surface d'une plantule dépendante de la vitesse d'allongement). L'apport de la modélisation permet de décomposer les effets des paramètres sur chaque étape en fonction des conditions environnementales et d'apporter une analyse du scénario ayant conduit aux résultats de levée.

Par ailleurs, l'analyse des causes de non levées est plus détaillée que celle rendue possible par les observations de terrain. Il est en effet souvent difficile de diagnostiquer au champ les causes de non levées en raison du temps nécessaire et de la difficulté de ces observations. Les simulations permettent de déterminer les parts respectives des causes de mortalité dues à l'absence de germination ou à des contraintes survenues lors de la croissance après germination. Les résultats obtenus dans cette étude sur *M.tr.* sont similaires à ceux généralement observés sur les grandes cultures : l'étape de germination est très souvent franchie et la part de la variabilité sur les résultats de levée est largement due au déroulement de la seconde étape. De faibles taux de germination peuvent être cependant observés en raison d'une longue période de froid ou d'un stress hydrique prolongé. Les obstacles de surface constituent les causes majeures de pertes importantes à la levée. Mais améliorer la force exercée par les plantes n'est pas la seule voie possible d'amélioration : il faut aussi accélérer l'arrivée à la surface des plantes en jouant sur tous les paramètres possibles.

Le modèle nous permet d'évaluer les effets de la diversité génotypique sur la levée lorsque le comportement observé peut être formalisé par un paramètre du modèle. Notre étude a mis en évidence des comportements contrastés en dehors des gammes de conditions environnementales considérées par

le modèle. Ces comportements ne sont pas représentés par les paramètres du modèle, mais pourraient être pris en compte en modifiant le formalisme du modèle. Ce cas de figure est illustré par l'effet des températures supra-optimales sur la vitesse de germination. Bien que peu fréquentes, de telles conditions peuvent être observées et constituer un réel inconvénient lors des phases précoces d'implantation. Une autre limite du modèle est de ne pas représenter l'apparition de plantules anormales en conditions de très basses températures. L'intégration des réponses aux températures extrêmes, au-delà du seul calcul de sommes de temps thermiques, et donc de la zone de réponse linéaire aux variations de températures, constitue une voie d'amélioration des prévisions du modèle. Cela permettrait d'élargir sa gamme de prévision et de représenter l'effet de conditions climatiques extrêmes.

D'autres facteurs abiotiques, tels que la sensibilité à la composition minérale de sols particuliers (pH, salinité, présence de métaux lourds) peuvent avoir dans des conditions particulières un effet sur la levée. Ces effets pourraient être représentés à l'aide de relations et donc des paramètres intégrant la réponse à des carences ou des excès en certains éléments. Les effets de facteurs biotiques, i.e. les effets de parasites s'attaquant aux semences, seraient à intégrer. On pourrait chercher l'existence de relations entre la résistance à un pathogène et des caractéristiques inhérentes au lot de semences, qui pourraient alors être intégrées *via* des équations à paramétrer dans le modèle. Il pourrait aussi exister des relations entre les conditions physico-chimiques du lit de semences et l'activité de pathogènes, qui seraient alors à intégrer au modèle. Les connaissances à l'heure actuelle ne permettent pas d'intégrer de telles relations. On peut considérer qu'il s'agit d'un challenge important.

L'avantage du modèle SIMPLE est d'être modulable. Le développement de nouveaux modules destinés à intégrer une caractéristique jusqu'alors non prise en compte dans le modèle est possible au prix d'une formalisation de la réponse de la plante aux variations des facteurs et conditions que l'on souhaite intégrer.

Perspectives pour la sélection en vue de l'amélioration de l'implantation des cultures

En combinant la caractérisation des génotypes et les résultats de simulations, des priorités d'études peuvent être définies. L'analyse des simulations nous a permis de mesurer l'impact sur la levée, de la variation d'un ou plusieurs paramètres traduisant un comportement observé. En extrêmisant les valeurs de ces paramètres, l'ampleur de leurs effets sur le taux final de levée, est de l'ordre de 15 à 20% ; entre le meilleur cultivar et l'idéotype réunissant les valeurs de paramètres les plus favorables, elle est en moyenne de 5 à 10%. L'ampleur moyenne des différences de levée peut paraître limitée et à considérer si l'on souhaite entreprendre une démarche d'amélioration d'un ou de plusieurs caractères. Cependant, dans des conditions environnementales extrêmes, les différences de levée s'amplifient. L'ampleur des effets des conditions de milieu défavorables justifie une démarche d'amélioration de caractères pertinents que nous avons cherché à identifier.

Nous avons montré des différences génotypiques sur la réponse aux facteurs environnementaux ayant un effet majeur sur la levée. Concernant les effets des basses températures et du stress hydrique, nous avons évoqué des mécanismes qui pourraient être impliqués. Concernant les effets du stress hydrique, ces différents mécanismes portent sur l'entrée d'eau dans la semence et/ou dans la cellule, son interaction avec la composition de la graine et un éventuel effet du métabolisme des sucres. Les mécanismes sous-jacents aux effets du froid pourraient impliquer des modifications des possibilités d'extension cellulaire, liées aux propriétés des parois et des membranes. De telles hypothèses doivent être testées et permettraient de proposer l'étude de voies métaboliques sous-jacentes aux comportements observés. Cela orienterait la recherche de gènes candidats *in silico*. Cette étape de l'analyse écophysiologique est nécessaire pour construire le pont avec des études de déterminisme génétique qui soient ciblées sur l'amélioration de caractères portant sur l'implantation des cultures. L'analyse du déterminisme génétique des paramètres du modèle ayant des effets majeurs sur les étapes d'implantation s'inscrit aussi dans un schéma d'amélioration transférable aux Légumineuses cultivées et à d'autres espèces d'intérêt agronomique. Cela peut permettre d'orienter la création de fonds génétiques qui cumulent ces caractères. Une autre perspective porte sur l'utilisation des modèles pour prédire des comportements, en intégrant les effets de paramètres *via* leurs composantes génétiques. Comme cela a été présenté en conclusion du chapitre 3, de telles approches commencent à se développer sur d'autres espèces et d'autres étapes du cycle (haricot, White et Hoogenboom, 1996 ; maïs, Raymond *et al.*, 2003 ; orge, Yin *et al.*, 2003 ; seigle, Chapman *et al.*, 2003 ; pêcher, Quilot *et al.*, 2005b ; soja, Messina *et al.*, 2006 ; Dorlodot *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces perspectives offertes par ces travaux doit contribuer à renforcer les approches interdisciplinaires menées à différentes échelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Addae PC, Pearson CJ. 1992.** Thermal requirements for germination and seedling growth of wheat. *Australian journal of Agricultural Research* 43: 585-594.
- Al-Alani A, Bruzau F, Raymond P, Saint-Ges V, Leblac JM, Pradet A. 1985.** Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressure. *Plant Physiology* 79: 885-890.
- Ameline-Torregrosa C, Cazaux M, Danesh D, Chardon F, Cannon SB, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B, Young ND, Samac D, Huguet T, Jacquet C. 2008.** Genetic dissection of resistance to Anthracnose and powdery mildew in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 61-69.
- Argyris J, Truco MJ, Ochoa O, Knapp SJ, Still DW, Lenssen GM, Schut JW, Micelmore RW, Bradford KJ. 2005.** Quantitative trait loci associated with seed and seedling traits in *Lactuca*. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1365-1376.
- Arndt W. 1965.** The Impedance of soil seals and the forces of emerging seedlings. *Australian Journal of Soil Research* 3: 55-68.
- Assuero SG, Mollier A, Pellerin S. 2004.** The decrease in growth phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Cell and Environment* 27: 887-895.
- Aubertot JN. 1998.** Contribution à la mise au point d'un modèle de prévision des levées: modélisation de l'état structural du lit de semences et de ses effets sur la levée. Application à la betterave sucrière. Mémoire de thèse, INA P-G, Paris, 98 pages.
- Aubry C, Morère-Le Paven, Chateigner-Boutin AL, Teulat-Merah B, Ricoult C, Peltier D, Jalouzout R, Limami AM. 2003.** A gene encoding a germin-like protein, identified by a cDNA-AFLP approach, is specifically expressed during germination of *Phaesus vulgaris*. *Planta* 217: 466-475.
- Avia K. 2008.** Cartographie de QTL biochimiques et physiologiques de l'acclimatation au froid chez *Medicago truncatula* et approche des gènes candidats. Thèse.
- Awadhwai NK, Thierstein GE. 1985.** Soil crust and its impact on crop establishment: a review. *Soil and Tillage Research* 5: 289-302.
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner M-H, Coste F, Corbineau F, Côme D. 2001.** Changes in oligosaccharides content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52: 701-708.
- Bailly C. 2004.** Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.
- Barrett B, Baird I, Woodfield D. 2005.** A QTL analysis of white clover seed production. *Crop Science* 45:1844-1850.

- Begonia GB, Begonia MT. 2007.** Plant photosynthetic production as controlled by leaf growth, phenology, and behaviour. *Photosynthetica* 45: 321-333.
- Benjamin LR. 1990.** Variation in time of seedling emergence within populations: a feature that determines individual growth and development. *Advances in Agronomy* 44: 1-25.
- Bernier F, Berna A. 2001.** Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 545-554.
- Betty M, Finch-Savage WE. 1998.** Stress protein content of mature Brassica seeds and their germination performance. *Seed Science Research* 8: 347-355.
- Betty M, Finch-Savage WE, King GJ, Lynn J R. 2000.** Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. *New Phytologist* 148: 277-286.
- Bewley JD, Black M. 1994.** Seeds Physiology of development and germination. Plenum Publishing Corporation, New York USA. 445 pages.
- Bierhuizen JF, Wagenvoort 1974.** Some aspects of seed germination in vegetales. I. The determination and application of heat sums and minimum temperature for germination. *Scientia Horticulturae* 2: 213-219.
- Bishnoi UR, Garton S, Maiga A. 1997.** Germination of sorghum cultivars at different pH levels and moisture potentials. *Annals of Arid Zone* 36: 31-36.
- Blondon, F, Marie D, Brown S, Kondorosi A. 1994.** Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* 37: 264-270.
- Bo-Keun H, Bennett JB, Hussey RS, Finnerty SL, Boerma HR. 2004.** Pedigree analysis of a major QTL conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Crop Science*. 44: 758–763.
- Boiffin J. 1984.** La dégradation structurale des couches superficielles sous l'action des pluies. Thèse de docteur ingénieur, INAPG, Paris 320 pages.
- Boiffin J, Durr C, Fleury A, Marin-Lafèche A, Maillet I 1992.** Analysis of the variability of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) growth during the early stages. I - Influence of various conditions of crop establishment. *Agronomie* 12: 515-525.
- Boizard H., Richard G, Roger-Estrade J, Dürr C, Boiffin J. 2002.** Cumulative effects of cropping systems on the structure of the tilled layer in northern France. *Soil and Tillage Research* 64: 149-164.
- Botwright T, Rebetze G, Condon T, Richards R, 2001.** The effect of *rht* genotype and temperature on coleoptile growth and dry matter partitionning in young wheat seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 417-423.
- Bouchabké O, Tardieu F, Simonneau T, 2006.** Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand under moderate irrigation but not in water-saturated soil. *Plant, Cell and Environment* 29: 1138-1148.
- Bouaziz A, Bruckler L. 1989a.** Modelling of wheat imbibition and germination as influenced by soil physical properties. *Soil Science Society of America Journal* 53: 219-227.

- Bouaziz A, Bruckler L. 1989b.** Modelling wheat seedling growth and emergence: I. Seedling growth affected by soil water potential. *Soil Science Society of America Journal* 53: 1831-1838.
- Bouaziz A, Bruckler L, 1989c.** Modelling wheat seedling growth and emergence: II. Comparison with field experiments. *Soil Science Society of America Journal* 53: 1838-1846.
- Bouaziz A, Hicks DR. 1990.** Consumption of wheat seed reserves during germination and early growth as affected by soil water potential. *Plant and Soil* 128 : 161-165.
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larré C, Satour P, Leprince. 2006.** Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology* 140: 1418-1436.
- Bourion V, Lejeune-Hénaut I, Munier-Jolain N, Salon C. 2003.** Cold acclimation of winter and spring peas : carbon partitioning as affected by light intensity. *European Journal of Agronomy* 19: 535-548.
- Brisson N, Mary B, Ripoche D, Jeuffroy MH, Ruget F, Nicoullaud B, Gate P, Devienne-Barret F, Antonioletti R, Dürr C, Richard G, Beaudoin N, Recous S, Tayot X, Plenet D, Cellier P, Machet JM, Meynard JM, Delécolle R. 1998.** STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parametrization applied to wheat and corn. *Agronomie* 18, 311-346.
- Bruckler L. 1983.** Rôle des propriétés physiques du lit de semences sur l'imbibition et la germination. I. Elaboration d'un modèle du système 'terre-graine.' *Agronomie* 3 : 213-222.
- Buitink J, Ly Vu B, Satour P, Leprince O. 2003.** The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. Seeds. *Seed Science Research* 13: 273-286.
- Buitink J, Leger J, Guisle I, Ly Vu B, Wuillème S, Lamirault G, Le Bars A, Le Meur N, Becker A, Küster H, Leprince O. 2006.** Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds *The Plant Journal* 47: 735–750.
- Cannon SB, McCombie WR, Sato S, Tabata S, Denny R, Palmer L, Katari M, Young ND, Stacey G. 2003.** Evolution and microsynteny of the apyrase gene family in three legume genomes. *Molecular Genetics Genomics* 270: 347-361.
- Carrera A, Dürr C. 2003.** Analysis of the effects of sowing date and sowing conditions on sugar beet emergence using the SIMPLE (SIMulation of PLant Emergence) model. *Advances in Sugar Beet Research* 5: 95-106.
- Carrera A. 2006.** Analyse et modélisation de la levée sous croûte. Contribution à l'amélioration du modèle SIMPLE. Thèse. 86 pages.
- Cantliffe DJ, Schuler KD, Guedes AC. 2000.** Overcoming seed thermodormancy in a heat-sensitive romaine lettuce by seed priming. *HortScience* 16:196–198.

- Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffé P, Rousselle P, Buret M. 2002.** QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato : a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* 53: 2089-2098.
- Chapman S, Cooper M, Podlich D, Hammer G. 2003.** Evaluating plant breeding strategies by simulating gene action in dryland environment effects. *Agronomy Journal* 95:99-113.
- Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P. 2006.** Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiology* 142: 1493-1510.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2007.** Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12, 444-451.
- Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR. 2004.** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101: 15289-15294.
- Churchill GA, Doerge RW. 1994.** Empirical Threshold Values for Quantitative Trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Cocks PS. 1990.** Dynamics of flower and pod production in annual medics (*Medicago* spp.). I. spaced plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 41: 911-921.
- Colbach N, Dürr C, Roger-Estrade J, Chauvel B. 2006a.** ALOMYSYS : modelling black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) germination and emergence in interaction with seed characteristics, tillage and soil climate. I Construction, *European Journal of Agronomy* 24: 95-112.
- Colbach N, Busset H, Yamada O, Dürr C, Caneill J. 2006b.** ALOMYSYS : modelling black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) germination and emergence in interaction with seed characteristics, tillage and soil climate. II Evaluation, *European Journal of Agronomy* 24: 113-128.
- Colbach N, Durr C, Gruber S, Pekrun C. 2008.** Modelling the seed bank evolution and emergence of oilseed rape volunteers for managing co-existence of GM and non-GM varieties. *European Journal of Agronomy* 28: 19-32.
- Côme D. 1975.** Rôle de l'eau, de l'oxygène et de la température dans la germination. In : Chaussat R, Le Deunff Y. (eds). La germination des semences Gauthier-Villars, Paris, pp 27-44.
- Côme D, Corbineau F. 2006.** Dictionnaire de la biologie des semences et des plantules. Editions Tec&Doc Lavoisier. 226 pages.
- Copeland LO, Mc Donald M.B. 2001.** Principles of seed science and technology. Fourth edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 467 pages.
- Cook DR, 1999.** *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* 2: 301-304.
- Cooper CS. 1977.** Growth of the legume seedling. *Advances in Agronomy* 29:119-139.
- Coste F, Crozat Y, Ladonne F, Wagner MH. 2002.** Integrating seed age heterogeneity, desiccation rate and seed ageing rate for optimising both bean seed lot quality and seed yield. *Seed Science and Technology* 30: 586-596.

- Covell S, Ellis RH, Roberts EH, Summerfield RJ. 1986.** The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. *Journal of Experimental Botany* 37: 707-715.
- Cui KH, Peng SB, Xing YZ, Xu CG, Yu SB, Zhang Q. 2002.** Molecular dissection of seedling vigor and associated physiological traits in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 1005: 745-753.
- Cvitanich C, Sandal N, Jensen DB, Busk H, Husted S, Stougaard J, Jensen EØ. 2007.** Isolation and characterization of *Lotus japonicus* genes involved in iron and zinc homeostasis. Conférence Zinc Crop 24-26 Mai 2007, Istanbul, Turquie.
- Dahal P, Bradford KJ. 1994.** Hydrothermal time analysis of tomato seed germination at suboptimal temperature and reduced water potential. *Seed Science Research* 4, 71-80.
- Dhellemmes G. 2002.** Variabilité génétique des paramètres caractérisant la germination et la levée de différents génotypes de betterave sucrière. Mémoire fin d'étude ingénieur ISA Lille.
- Dehaye L, Duval M, Viguié D, Yaxley J, Job D. 1997.** Cloning and expression of the pea gene encoding SBP65, a seed specific biotinylated protein. *Plant Molecular Biology* 35: 605-62.
- Demilly D, Wagner M-H, Brunel S, Dürr C. 2007.** Computer vision for helping analysis of relationship between seed physical characteristics and germination and root elongation on *Medicago truncatula* – 28th ISTA Seed Symposium, Mai 2007, Iguassu Falls, Brésil.
- Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prosperi JM, Rochat C, Boutin JP. 2005.** Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 557-566.
- Dore T. 1994.** Influence des stress abiotiques sur l'évolution du nombre de ramifications et de tiges chez le pois. In : Agrophysiologie du pois protéagineux. Editions UNIP-ITCF-INRA pp145-156.
- Doré T, Le Bail M, Martin P, Ney B, Roger-Estrade J. 2006.** L'agronomie aujourd'hui. Quae éditions. Collection Synthèses 386 pages.
- Dorlédot S, Forster B, Pagès L, Prcie A, Tuberosa R, Draye X. 2007.** Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvements of crops. *Trends in Plant Science* 12: 474-481.
- Dorsainvil. 2002.** Optimisation des itinéraires techniques pour les cultures intermédiaires à l'aide de modèles sol-plante (SIMPLE et STICS). Thèse INA-PG. 150 pages.
- Dorsainvil F, Dürr C, Justes E, Carrera A, 2005.** Characterisation and modelling of white mustard (*Sinapis alba* L.) emergence under several sowing conditions. *European Journal of Agronomy*, 23: 146-158.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900-910.
- Durrant MJ, Dunning RA, Jaggard K, Bugg RB, Scott RK. 1988.** A census of seedling establishment in sugar-beet crops. *Annals of Applied Biology* 113: 327-345.
- Durrant MJ, Mash SJ. 1989.** Stimulation of sugarbeet hypocotyl extension with potassium nitrate. *Annals of Applied Biology* 115: 367-374.

- Dürr C, Boiffin J, Fleury A, Coulomb I. 1992.** Analysis of the variability of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) growth during the early stages. II - Factors influencing seedling size in field conditions. *Agronomie* 12: 527-235.
- Dürr C, Boiffin J. 1995.** Sugarbeet seedling growth from germination to first leaf stage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 124: 427-435.
- Dürr C, Mary B. 1998.** Effects of Nutrient Supply on Pre-emergence Growth and Nutrient Absorption in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Annals of Botany* 81: 665-672.
- Dürr C, Guévaer F, Guillet JM. 2000.** Pre-mergence growth of genotypes of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) tolerant to rhizomania. *Annals of Botany* 85: 197-202.
- Dürr C, Aubertot JN. 2001.** Emergence of seedlings of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) as affected by the size, roughness of aggregates in the seedbed. *Plant and soil* 219:211-220.
- Dürr C, Aubertot JN, Richard G, Dubrulle P, Duval Y, Boiffin J. 2001.** SIMPLE: a model for SIMulation of PLant Emergence predicting the effects of soil tillage and sowing operations. *Soil Science Society of America Journal* 65: 414-42.
- Dürr C. 2002.** Analyse et modélisation de l'implantation des cultures Habilitation à Diriger des Recherches. Université d'Orsay Paris XI.
- Dürr C, Dénoyer N, Peltier E, Leforestier C, Moreau-Valancogne P. 2008.** Variability of flax (*Linum usitatissimum*) emergence: field experiments and assessment of the risk of poor emergence using a crop emergence model. 9th ISSS Conference on Seed Biology, Juillet 2008, Pologne.
- Duval Y, Boiffin J. 1994.** A daily emergence disturbance index for sugarbeet based on soil crusting. In: Soil Tillage for crop production and protection of the environment, Proc. of 13th ISTRO Conference, H.E. Jensen (ed), Aalborg (DK): 633-638.
- Eagles HA, Hardacre AK, 1979.** Genetic variation in maize (*Zea Mays* L.) for germination and emergence at 10°C. *Euphytica* 28: 287-295.
- Ellis MH, Rebetzke GJ, Chandler P, Bonnett D, Spielmeyer W, Richards RA. 2004.** The effect of different height reducing genes on the early growth of wheat. *Functional Plant Biology* 31: 583-589.
- Epinat-Le Signor C, Dousse S, Lorgeou J, Denis JB, Bonhomme R, Carolo P, Charcosset A. 2001.** Interpretation of Genotype x Environment Interactions for Early Maize Hybrids over 12 Years. *Crop Science*. 41: 663–669.
- Finch-Savage WE, Steckel JRA, Phelps K. 1998.** Germination and post-germination growth to carrot seedling emergence: predictive threshold models and sources of variation between sowing occasions. *New Phytologist* 139:505-516.
- Finkelstein RR, Zeevaart JA. 1994.** Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. In, Somerville et Meyerowitz E (eds), *Arabidopsis* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbour Laboratory Press), pp 523-533.

- Fougereux J.A. 1994.** Etude de l'influence de l'alimentation hydrique du porte-graine sur la qualité germinative des semences de pois protéagineux (*Pisum sativum* L.). Thèse de doctorat INA Paris Grignon, 174 pages.
- Frei A, Blair MW, Cardona C, Beebe SE, Gu H, Dorn S. 2005.** QTL mapping of resistance to *Thrips palmi* Karny in common bean. *Crop Science* 45: 379-387.
- Fyfield TP, Gregory PJ. 1989.** Effects of temperature and water potential on germination, radicle elongation and emergence of Mungbean. *Journal of Experimental Botany* 40: 667-674.
- Gallardo K , Firnhaber C, Zube, H, Héricher D, Belghazi M, Henry C, Küster H, Thompson R. 2007a.** A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 2165-2179.
- Gallardo K, Le Signor C, Darmency M, Burstin J, Thompson R, Rochat C, Boutin JP, Kuester H, Buitink J, Leprince O, Limami A, Grusak MA, 2007b.** *Seed Biology of Medicago truncatula* In: The *Medicago truncatula* Handbook. ISBN 0-9754303-1-9. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook>
- Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. 2003.** Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology* 133: 664-682.
- Gallardo-Carrera A, Leonard J, Duval Y, Dürr C. 2007.** Effects of seedbed structure and water content at sowing on the development of soil surface crusting under rainfall. *Soil Tillage Research*, 95: 207-217.
- Garcia J, Barker DG, Journet EP. 2007.** Seed Storage and germination. In: The *Medicago truncatula* Handbook. ISBN 0-9754303-1-9. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook>
- Gardarin A, Dürr C, Colbach N. 2008.** Which model species for seedbank dynamics and weed emergence studies? A review. *Weed Research* sous presse.
- Garnier A, Lecomte J. 2006.** Using a spatial and stage-structured invasion model to assess environmental risks of transgene escape via feral populations of oilseed rape. *Ecological Modelling* 194: 141-149.
- Gendreau E, Traas, J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Hofte H. 1997.** Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 114: 295-305.
- Gerard CJ. 1980.** Emergence Force by Cotton Seedlings. *Agronomy Journal* 72: 473-476.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF. 2000.** Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* 124: 1854-1865.
- Gosse G, Varlet-Granchet C, Bonhomme R, Chartier M, Allirand JM, Lemaire G. 1986.** Production maximale de matière sèche et rayonnement solaire intercepté par un couvert végétal. *Agronomie* 6: 47-56.
- Granier C, Massonnet, C, Turc O, Muller B, Chenu K, Tardieu F. 2002.** Individual leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a stable thermal-time-based programme. *Annals of Botany* 89: 595-604.

- Gray D, Steckel JRA. 1983.** Some effects of umbel order and harvest date on carrot seed variability and seedling performance. *Journal of Horticultural Science* 58: 73-82.
- Gummerson RJ. 1986.** Effects of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. *Journal of Experimental Botany* 37: 729-741.
- Gutschick VP, Simonneau T. 2002.** Modelling stomatal conductance of field-grown sunflower under varying soil water content and leaf environment: comparison of three models of stomatal response to leaf environment and coupling with an abscisic acid-based model of stomatal response to soil drying. *Plant, Cell and Environment* 25: 1423-1434.
- Haley CS, Knott SA. 1992** A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.
- Hammer G, Cooper M, Tardieu F, Welsh S, Walsh B, van Eeuwijk F, Chapman S, Podlich D. 2006.** Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. *Trends in Plant Science* 11: 587-593.
- Hampton JG. 1981.** The relationship between field emergence laboratory germination, and vigour testing of New Zealand seed wheat lines. *Journal of Experimental Agriculture* 9: 191-197.
- Herrmann D, Boller B, Studer B, Widmer F, Kolliker R. 2006.** QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:536–545.
- Hitz WD, Carlson TJ, Kerr PS, Sebastian SA. 2002.** Biochemical and Molecular Characterization of a Mutation That Confers a Decreased Raffinosaccharide and Phytic Acid Phenotype on Soybean Seeds *Plant Physiology* 128: 650-660.
- Huguet T, Thoquet P, Gherardi M, Cardinet G, Prioul S, Lazrek F, Aouani ME, Laouar M, Abdelguerfi A, Kurchak O, Jacquet C, Torregrosa C, Julier B, Kiss E, Batut J, Prosperi J. 2004.** A postgenomic approach of the natural variations of the model-legume *Medicago truncatula*. Legumes for the benefit of agriculture, nutrition and the environment: their genomics, their products, and their improvement, AEP, Dijon, pp 169-170.
- Irzykowska L, Wolko B 2004.** Interval mapping of QTLs controlling yield-related traits and seed protein content in *Pisum sativum*. *Journal of Applied Genetics* 45: 297-306.
- ISTA. 2007.** *International rules for seed testing*. International Seed Testing Association Basserdorf. Chapter 55.
- Jansen RC, Stam P. 1994.** High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Jensen EH, Frelich, JR, Gifford RO. 1972.** Emergence force of forage seedlings. *Agronomy Journal* 64: 635-639.
- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre JB, Prosperi JM, Barre P, Huygh C. 2007.** Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1391–1406.

- Kalo P, Endre G, Zimanyi L, Csanadi G, Kiss GB, 2000.** Construction of an improved linkage map diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 641–657.
- Kerkoud M, Esquibet M, Plantard O, Avrillon M, Guimier C, Franck M, Léchappé J, Mathis R. 2007.** Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 323-332.
- Klos K, Brummer E. 2000.** Response of six alfalfa populations to selection under laboratory conditions for germination and seedling vigour at low temperatures. *Crop science* 40: 959-964.
- Kolasinska K, Szyrmer J, Dul S. 2000.** Relationship between laboratory seed quality tests and field emergence of common bean seed. *Crop Science* 40: 470-475.
- Kolkman JM, Kelly JD, 2003.** QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. *Crop Science* 43: 539-548.
- Kolopp J. 2008.** Validation de (SIMulation of PLant Emergence) pour les variétés de printemps et d'hiver de pois protéagineux. 24 p. Mémoire de fin d'études SupAgroMontpellier-AgrocampusOuest.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen C. 1984.** The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61: 377-383.
- Krochko JE, Bewley D. 2000.** Seed storage proteins in cultivars and subspecies of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Seed Science Research* 10: 423-434.
- Kulik MM, Yaklich RW. 1982.** Evaluation of vigor tests in soybean seeds: relationship of accelerated aging, cold, sand bench, and speed of germination tests to field performance. *Crop Science* 22: 766-770.
- Kuo TM, Van Middlesworth JF, Wolf WJ. 1988.** Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Agricultural Food Chemistry* 36: 32-36.
- Lander ES, Botstein D. 1989.** Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Laperche A, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Gardet O, Hanocq E, Devienne-Barret F, Le Gouis J, 2007.** Using genotype x nitrogen interaction variables to evaluate the QTL involved in wheat tolerance to nitrogen constraints *Theoretical and Applied Genetics* 115: 399-415.
- Laperche A, Devienne-Barret F, Maury O, Le Gouis J, Ney B, 2006.** A simplified conceptual model of carbon/nitrogen functioning for QTL analysis of winter wheat adaptation to nitrogen. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1131-1146.
- Larsen SU, Povlsen FV, Eriksen EN, Pedersen HC. 1998.** The influence of seed vigour on field performance and the evaluation of the applicability of the controlled deterioration vigour test in oil seed rape (*Brassica napus*) and pea (*Pisum sativum*). *Seed Science and Technology* 26: 627-641.
- Lawrence DM, Halmer P, Bowles DJ. 1990.** Mobilisation of storage reserves during germination and early seedling growth of sugar beet. *Physiologia Plantarum* 78: 421-429.

- Leclerc JC. 1999.** Ecophysiologie végétale. Publications de l'Université de Saint Etienne. ISBN 2-86272-163-8. 277 pages.
- Le Deunff. 1975.** La régulation hormonale de la germination : le cas des céréales. In : Chaussat R, Le Deunff Y. (eds). La germination des Semences. Gauthier-Villars, Paris, pp 81-93.
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A. 2006.** Functional analysis of Arabidopsis *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy *The Plant Journal* 45: 309-319.
- MacPhee K, Grusak M. 2006.** Identification of QTL controlling seed mineral content in pea. International Conference on Legume Genomics and Genetics p109.
- Marshall B, Squire GR. 1996.** Non-linearity in rate-temperature relations of germination in oilseed rape. *Journal of Experimental Botany* 47: 1369-1375.
- Martin I, De La Cuadra C. 2004.** Evaluation of different scarification methods to remove hardseedness in *Trifolium subterraneum* and *Medicago Polymorpha* accessions of the Spanish base genebank. *Seed Science and Technology* 32: 671-681.
- Masin R, Zuin MC, Archer DW, Forcella F, Zanin G. 2005.** WeedTurf: a predictive model to aid control of annual summer weeds in turf. *Weed Science* 53:193-201.
- Mazibuko TG, Modi AT. 2005.** Regulation of water absorption by Ca²⁺ osmolarity alleviates cotyledonal cracking in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Science and Technology* 33: 303-313.
- Messina CD, Jones JW, Boote KJ, Vallejos CE. 2006.** A gene based model to simulate soybean development and yield responses to environment. *Crop Science* 46: 456-466.
- Michel BE. 1983.** Evaluation of the water potentials of solution of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology* 72: 66-70.
- Milford GFJ, Biscoe PV, Jaggard KW, Scott RK, Draycott AP. 1980.** Physiological potential for increasing yields of sugar beet. *Opportunities for increasing crop yields*: pp: 71-83 Pitman Publishing, London, UK.
- Moreau D, Salon C, Munier-Jolain N. 2006.** Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: an effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant, Cell and Environment* 29: 1087-1098.
- Moreau D, Salon C, Munier-Jolain N. 2007.** A model-based framework for the phenotypic characterization of flowering of *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment* 30: 213-224.
- Moreau D. 2007.** Réponse du développement et de la croissance de *Medicago truncatula* aux facteurs environnementaux : contribution à l'élaboration d'outils de phénotypage pour l'analyse de la variabilité génétique associée à la nutrition azotée. Thèse. 148 pages.

- Moreau-Valancogne P, Coste F, Durr C, Crozat Y 2007.** Effects of bean seed production conditions on germination and elongation responses to temperature and water potential. In *Seeds: Adkins SW, Navie SC and Ashmore S (eds). Biology, Development and Ecology*. 35: 333-341. CABI publishing UK.
- Moreau-Valancogne P, Coste F, Crozat Y, Dürr C. 2008.** Field emergence of bean seed lots: characterisation, modelling and simulation. *European Journal of Agronomy* 28: 309-320.
- Mullins CE, Townend J, Mtakwa PW, Payne CA, Cowan G, Simmonds LP, Daamen CC, Dunbabin T, Naylor REL. 1996.** Emerge user guide: a model to predict crop emergence in the semi-arid tropics. University of Aberdeen, Department of Plant and Soil Science. 96 p.
- Nabi G, Mullins CE, Montemayor MB, Akhtar MS. 2001.** Germination and emergence of irrigated cotton in Pakistan in relation to sowing depth and physical properties of the seedbed. *Soil and Tillage Research* 59: 33-44.
- Nafziger ED, Carter PR, Graham EE. 1991.** Response of corn to uneven emergence. *Crop Science* 31: 811-815.
- Nakamoto H, Vigh L. 2007.** The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 294-306.
- Nakamura C, Skaracis GN, Romagosa I. 1991.** Cytogenetics and breeding in sugar beet. In: *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Part B. pp 295-314.
- Nascimento WM, Pereira RS. 2007.** Preventing thermo-inhibition in carrot by seed priming. *Seed Science and Technology* 35: 504-507.
- Neumann G, Preissler M, Azaizah HA, Romheld V. 1999.** Thiamine (vitamin B1) seed treatment enhances germination and seedling growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) exposed to soaking injury. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 162 : 295-300.
- Nishiyama I, 1972.** Physiological kinks around 15, 30, 45°C in plants. Research Bulletin Hokkaido National Agricultural Experiment Station 47: 125-168.
- Nishiyama I, 1974.** A break in the Arrhenius plot of germination activity in rice seeds. *Plant Cell Physiology* 533-534.
- Ohto M, Stone SL, Harada JJ. 2007.** Genetic control of seed development and seed mass. In: Bradford (ed), *Seed development, dormancy and germination*. Annual Plant Reviews, Blackwell Publishing, Oxford vol 27: 1-24.
- Pascualides AL, Planchuelo AM. 2007.** Seed morphology and imbibition pattern of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). *Seed Science and Technology* 35: 760-764.
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA. 2006.** Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals expression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* 18: 1887-1899.
- Penfield S. 2008.** Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist* 179: 615-628.

- Pierre JB. 2008.** Recherche de déterminants génétiques de la date de floraison chez la Légumineuse modèle, *Medicago truncatula*. Thèse. 143 pages.
- Pierre JB, Huguet T, Barre P, Huyghe C, Julier B. 2008.** Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 609-620.
- Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Barangé A, Coyne CJ. 2005.** Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology* 95: 1287-1293.
- Pinto Contreras M, Gaudillère JP 1987.** Efficacité de la croissance du blé lors du passage à l'autotrophie. *Plant Physiology and Biochemistry* 25: 35-42.
- Prosperi JM, Oliviers I, Angevain M, Nansat P. 1993.** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Dans le courrier de l'environnement de L'INRA, sauve qui peut ! n°4.
- Puckridge DW, French DJ. 1983.** The annual legume pasture in cereal Ley-farming systems in South Australia a review. *Agricultural Ecosystem Environment* 9: 229-267.
- Quilot B, Kervella J, Génard M, Lescourret F. 2005a.** Analysing the genetic control of peach fruit quality through an ecophysiological model combined with a QTL approach. *Journal of Experimental Botany* 422: 3083-3092.
- Quilot B, Génard M, Lescourret F Kervella J. 2005b.** Simulating genotypic variation of fruit quality in advanced peach x *Prunus davidiana* cross. *Journal of Experimental Botany* 56: 3071-3081.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SPC, Belghazi M, Job C, Job D. 2008.** Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology* 148: 620-641.
- Rasmusson DC. 1987.** An evaluation of ideotype breeding. *Crop Science* 27: 1140-1146.
- Raveneau MP, Moreau-Valancogne P, Coste F, Lejeune I, Dürr C. 2008.** Temperature and water potential effects on two grain legumes, pea (*Pisum sativum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germination and heterotrophic growth. *European Journal of Agronomy*, submitted.
- Raymond P, Al-Alani A, Pardet A. 1985.** ATP production and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. *Plant Physiology* 79: 879-884.
- Rebetzke GJ, Richards RA, Fettell NA, Long M, Condon AG, Forrester RI, Botwright TL. 2007.** Genotypic increases in coleoptile length improves stand establishment, vigour and grain yield of deep-sown wheat. *Field Crops Research* 100: 10-23.
- Reyes de los BG, Myers SJ, McGrath JM. 2003.** Differential induction of glyoxylate cycle enzymes by stress as marker for seedling vigor in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Molecular Genetics and Genomics* 269: 692-698.

- Reymond M, Muller B, Leonardi A, Charcosset A, Tardieu F. 2003.** Combining Quantitative Trait Loci Analysis and an ecophysiological Model to analyze the genetic Variability of the Responses of Maize leaf Growth to temperature and water Deficit. *Plant Physiology* 131: 664-675.
- Richard G, Guérif J. 1988a.** Modélisation des transferts gazeux dans le lit de semences: application au diagnostic des conditions d'hypoxie des semences de betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) pendant la germination. I. Présentation du modèle, *Agronomie* 8: 539–547.
- Richard G, Guérif J. 1988b.** Modélisation des transferts gazeux dans le lit de semences: application au diagnostic des conditions d'hypoxie des semences de betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) pendant la germination. II. Résultats des simulations, *Agronomie* 8: 639–646.
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL, Prosperi JM. 2006.** Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* 6: 28.
- Rosnoblet C, Aubry C, Leprince O, Ly Vu B, Rogniaux H, Buitink J. 2007.** The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal* 51: 47-59.
- Rowse HR, Finch-Savage, 2003.** Hydrothermal threshold models can describe the germination response of carrot (*Daucus carota*) and Onion (*Allium cepa*) seed populations across sub-and supra optimal temperatures. *New Phytologist* 158: 101-108.
- Saglio P, Pradet M. 1980.** Soluble sugars, respiration and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiology* 66: 516-519.
- Sampedro J, Cosgrove DJ. 2005.** The expansin superfamily. *Genome Biology* 6: 242-250.
- Satour P, Hoeskstra FA, Ly-Vu B, Leprince O, Buitink J. 2008.** MtEM6, a group I LEA protein correlates with seed longevity. 9ème ISSS Pologne. Publié dans Supp.no 5 Polish Journal of Natural Science.
- Schopfer P. 2006.** Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany* 93: 1415–1425.
- Schneider A. 1998.** Variability of maize seed imbibition rates as influenced by seed size distribution and coating application. *Agronomie* 18: 247-260.
- Schweizer P, Christoffel A, Dudler R. 1999.** Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant Journal* 20: 541–552.
- Sillon JF, Richard G, Cousin I. 2003.** Quantifying and modelling the effect of soil structure induced by tillage and traffic on soil drying. *Geoderma* 116: 29-46.
- Sinclair TR, Neumaier N, Farias JRB, Nepomuceno AL. 2005.** Comparison of vegetative developpement in soybean cultivars for low-latitude environments. *Field Crop Research* 92: 53-59.
- Sinha AK, Guildyal BP. 1979.** Emergence force of crop seedlings. *Plant and Soil* 51: 153-156.

- Smith J, Smith P, Addiscott T. 1996.** Quantitative methods to evaluate and compare soil organic matter model: In: Powlson DS, Smith J, Smith P (eds), Evaluation of soil organic matters models. Springer-Verlag, Berlin, pp.181-199.
- Soller M, Brody T, Genizi A. 1976.** On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 35-39.
- Souty N, Stengel P, Rode C, Tuttoben, R. 1992.** A mechanistic study of maize emergence through superficial crusts. *Soil and Tillage Research* 23: 125-140.
- Souty N, Rode C. 1993.** Emergence of sugar beet seedlings from under different obstacles. *European journal of Agronomy* 2: 213-221.
- Souty N, Rode C. 1994a.** La levée des plantules au champ: un problème mécanique? *Sécheresse* 5: 13-22.
- Souty N, Rode C. 1994b.** Caractérisation des plantules de betterave sucrière et modélisation de l'émergence. In : Implantation de la betterave industrielle, INRA (ed), Paris pp : 39-54.
- Spear JD, Fehr WD. 2007.** Genetic improvement of seedling emergence of soybean lines with low phytate. *Crop Science* 47: 1354- 1360.
- Squire GR, 1999.** Temperature and heterogeneity of emergence time in oilseed rape. *Annual Applied Biology*. 135: 439-447.
- Stupnikova, I, Benamar, A, Tolleter, D, Grelet J, Borovskii G, Dorne AJ and Macherel D. 2006.** Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures *Plant Physiology* 140: 326-335.
- Sung D-Y, Kaplan F, Lee K-J, Guy CL. 2003.** Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* 8: 179-187.
- Tamet V, Boiffin J, Dürr C, Souty N. 1996.** Emergence and early growth of an epigeal seedling (*Daucus carota* L.): influence of soil temperature, sowing depth, soil crusting and seed weight. *Soil and Tillage Research* 40: 25-38.
- Tamura N, Yoshida T, Tanaka A, Sasaki R, Bando A, Toh S, Lepiniec L, Kawakami N. 2006.** Isolation and characterization of high temperature-resistant germination mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Physiology* 47:1081-1094.
- Tardieu F. 2003.** Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in plant Science* 8: 9-14.
- Tardieu F, Reymond M, Muller B, Granier C, Simonneau T, Sadok W, Welcker C. 2005.** Linking physiological and genetic analyses of the control of leaf growth under changing environmental conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 937-946.
- Taylor GB. 2005.** Hardseedness in Mediterranean annual pasture legumes in Australia: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56: 645-661.

- Taylor AG, Ten Broeck CW. 1988.** Seedling emergence forces of vegetable crops. *Horticultural Science* 23:367-369.
- Tekrony DM, Bustamam T, Egli DB, Pfeiffer TW. 1987.** Effects of soybean seed size, vigor and maturity on crop performance in row and hill plots. *Crop Science* 27: 1040-1045.
- Teulat B, Monneveux P, Wery J, Borries C, Souyris I, Charrier A, This D. 1997.** Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytologist* 137: 99-107.
- Thomas H. 2008.** Systems biology and the biology of systems: how, if at all, are they related? *New phytologist* 177: 11–15.
- Thomas WE, Burke IC, Spears JE, Wilcut JW. 2006.** Influence of environmental factors on slender amaranth (*Amaranthus viridis*) germination. *Weed Science* 54: 316-320.
- Thoquet P, Ghérardi M, Journet ET, Kereszt A, Ané JM, Prospéri JM, Huguet T. 2002.** The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biology* 2, 1.
- Timmerman-Vaughan GM, Mills A, Whitfield C, Frewa T, Butlera R, Murray S, Lakemand M, McCalluma J, Russell A, Wilson D. 2005.** Linkage Mapping of QTL for Seed Yield, Yield Components, and Developmental Traits in Pea. *Crop Science* 45: 1336-1344.
- Tivoli B, Barange A, Sivasithamparam K, Barbetti J, 2006.** Annual *Medicago*: From a Model Crop Challenged by a Spectrum of Necrotrophic Pathogens to a Model Plant to Explore the Nature of Disease Resistance. *Annals of Botany* 98: 1117-1128.
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Ohamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N, Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E, Kawakami N. 2008.** High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin in *Arabidopsis seeds*. *Plant Physiology* 146: 1368-1385.
- Tolletier D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel MH, Macherel D. 2007.** Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19: 1580-1589.
- Utz HF, Melchinger A.E. 1994.** Comparison of different approaches to interval mapping of quantitative trait loci. In: van Ooijen, J.W. and J.Jansen (eds), *Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers*, Wageningen, 195-204.
- Utz HF, Melchinger AE. 1996.** PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *Journal of Quantitative Trait Loci* 2 (1).
- Valdes VM, Bradford KJ, Mayberry KS. 1985.** Alleviation of thermodormancy in coated lettuce seeds by seed priming. *HortScience* 20:1112–1114

- Valenciano JB, Casquero, PA, Boto JA. 2004.** Influence of sowing techniques and pesticide application on the emergence and the establishment of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 24: 113-118.
- Vaultier MN, Cantrel C, Vergnolle C, Justin AM, Demandre C, Benhassaine-Kesri G, Cicek D, Zachowski A. 2006.** Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in Arabidopsis cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 580: 4218-4223.
- de Vienne D. 1998.** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales INRA Editions, Nancy.
- Visscher PM, Thompson R, Haley CS. 1996.** Confidence intervals for QTL locations using bootstrapping *Genetics* 143: 1013-1020.
- Vocanson A, Roger-Estrade J, Boizard H, Jeuffroy MH. 2006.** Effects of Soil Structure on Pea (*Pisum sativum* L.) Root Development According to Sowing Date and Cultivar. *Plant and Soil* 281: 121-135.
- Vocanson A, Jeuffroy MH. 2008.** Agronomic Performance of Different Pea Cultivars Under Various Sowing Periods and Contrasting Soil Structures. *Agronomy Journal* 100: 748-759.
- Voisin AS, Bourion V, Duc G, Salon C. 2007.** Using an ecophysiological analysis to dissect genetic variability and to propose an ideotype for nitrogen nutrition in Pea. *Annals of Botany* 100: 1525-1536.
- Wallach, D. 2006.** Evaluating crop models, p. 11-53, In D. Wallach, *et al.* (eds). Working with dynamic crop models: evaluating, analyzing, parameterizing and using them. Éditions INRA, Paris.
- Wang R, Bai Y, Tanino K. 2004.** Effect of seed size and sub-zero imbibition-temperature on the thermal time model of winterfat (*Eurotia lanata* (Pursh) Moq.). *Environmental and Experimental Botany* 51: 183-197.
- Wang R, Bai Y, Low NH, Tanino K. 2006.** Seed size variation in cold and freezing tolerance during seed germination of winterfat (*Krascheninnikovia lanata*) (*Chenopodiaceae*). *Canadian Journal of Botany* 84: 49-59.
- Weiser R.L, Wallner SJ, Waddell JW. 1990.** Cell wall and extension mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant Physiology* 93: 1021-1026.
- White JW, Hoogenboom G. 1996.** Simulating effects of genes for physiological traits in a process-oriented crop model. *Agronomy Journal* 88: 416-422.
- Witono H, Bruckler L. 1989.** Use of remotely sensed soil moisture content as boundary conditions in soil-atmosphere water transport modelling. Field variation of water flow model. *Water Resources Research* 25: 2423-2435.
- Williams W. 1956.** Evaluation of the emergence force exerted by seedlings of small seeded legumes using probit analysis. *Agronomy Journal* 48: 273-274.
- WinSIMPLE. 2003.** Logiciel reference à l'APP; CD Rom et notice

- Yamanaka N, Ninomiya S, Hoshi M, Tsubokura Y, Yano M, Nagamura Y, Sasaki T, Harada K. 2001.** An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, Leaflet Morphology and regions of segregation distortion. *DNA Research* 8: 61-72.
- Yan HH, Mudge J, Kim DJ, Larsen D, Schoemaker RC, Cook DR, Young ND. 2003.** Estimates of conserved microsynteny among genomes of *Glycine max*, *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied genetic* 106: 1256- 1265.
- Yin X, Kropff MJ, Stam P. 1999.** The role of ecophysiological models in QTL analysis: the example of specific leaf area in barley. *Heredity* 82: 415-421.
- Yin X, Chasaloow SD, Dourleijn CJ, Stam P, Kropff MJ. 2000.** Coupling estimated effects of QTLs for physiological traits to a crop growth model: predicting yield variation among recombinant inbred lines in barley. *Heredity* 85: 539-549.
- Yin X, Stam P, Kropff PS, Schapendonk AHCM. 2003.** Crop modelling, QTL mapping and their complementary role in plant breeding. *Agronomy Journal* 95: 90-98.
- Young ND, Mudge J, Ellis THN. 2003.** Legume genomes: more than peas in a pod. *Current opinion in plant biology* 6: 199-204.
- Zeng LW, Cocks PS, Kailis SG, Kuo J. 2005.** Structure of the seed coat and its relationship to seed softening in the Mediterranean annual Legume. *Seed Science and Technology* 33: 351-362
- Zeng ZB. 1994.** Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Ziegler P. 1995.** Carbohydrate degradation during germination. In: Kigel, J. and Galili, G (eds) *Seed Development and Germination*.pp 447-474.
- Zhang ZB, Yu T, HuangYG, Zhu. 2005.** Mapping quantitative trait loci (QTLs) for seedling-vigor using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crop Science* 91: 161-170.
- Zhu C, Chen J. 2007.** Changes in soluble sugar and antioxidant enzymes in peanut seeds during ultra dry storage and after accelerated aging. *Science and Technology* 35: 387-401.
- Zhu H, Kim DJ, Baek JM, Choi HK, Ellis LCL, Küester H, McCombie WR, Peng HM, Cook DR. 2003.** Syntenic relationships between *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* reveal extensive divergence of genome organization. *Plant Physiology* 131: 1018-1026.

ANNEXES

Annexe 3.1. Plan d'expérience utilisé pour le phénotypage de la population LR4 réalisé sur le banc de germination (SNES).

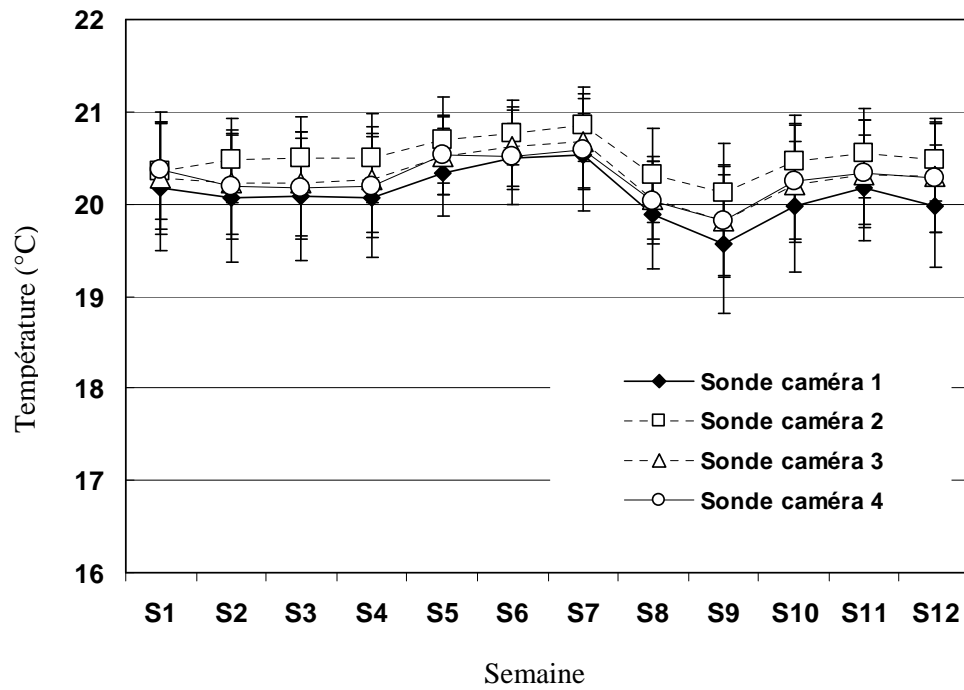
Chaque lignée, ainsi que les deux génotypes parentaux (A17 et DZA315.16) ont été semés une fois sous chaque caméra (4 répétitions par génotype). Pour obtenir les résultats d'une répétition de chaque génotype, il faut 3 semaines. Les groupes sont constitués de génotypes dont la germination est homogène (12 groupes répartis sur 4 « niveaux de vitesse de germination »). Chaque semaine, on sème 4 groupes : chaque groupe appartient à un « niveau » de germination différent.

Le génotype Paraggio est utilisé comme témoin : il est semé chaque semaine sous chaque caméra.

Semaine 1															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
9	66	18	7	70	17	203	109	29	54	143	13	100	108	142	152
10	194	141	234	235	83	42	200	45	57	60	14	101	116	144	159
102	79	140	131	215	6	26	56	214	125	2	15	105	127	147	160
63	110	119	paraggio	239	205	67	paraggio	241	225	12	paraggio	107	124	148	paraggio
groupe 1				groupe 4				groupe 7				groupe 10			
Semaine 2															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
49	8	226	186	61	48	155	55	19	27	38	58	168	182	190	201
154	99	229	211	164	39	187	36	20	31	40	69	169	64	191	206
4	62	111	3	188	115	162	50	23	32	44	71	11	184	193	208
77	158	196	paraggio	114	223	104	paraggio	24	35	47	paraggio	180	189	197	paraggio
groupe 2				groupe 5				groupe 8				groupe 11			
Semaine 3															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
33	5	59	136	86	65	128	43	72	76	84	95	209	219	231	243
92	1	207	46	51	236	224	21	73	78	88	96	210	220	232	244
97	135	93	166	25	118	53	230	74	80	89	98	213	222	DZA315.16	A17
212	170	157	paraggio	246	30	113	paraggio	75	81	91	paraggio	217	87	240	paraggio
groupe 3				groupe 6				groupe 9				groupe 12			
Semaine 4															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
100	108	142	152	9	66	18	7	70	17	203	109	29	54	143	13
101	116	144	159	10	194	141	234	235	83	42	200	45	57	60	14
105	127	147	160	102	79	140	131	215	6	26	56	214	125	2	15
107	124	148	paraggio	63	110	119	paraggio	239	205	67	paraggio	241	225	12	paraggio
groupe 10				groupe 1				groupe 4				groupe 7			
Semaine 5															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
168	182	190	201	49	8	226	186	61	48	155	55	19	27	38	58
169	64	191	206	154	99	229	211	164	39	187	36	20	31	40	69
11	184	193	208	4	62	111	3	188	115	162	50	23	32	44	71
180	189	197	paraggio	77	158	196	paraggio	114	223	104	paraggio	24	35	47	paraggio
groupe 11				groupe 2				groupe 5				groupe 8			
Semaine 6															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
209	219	231	243	33	5	59	136	86	65	128	43	72	76	84	95
210	220	232	244	92	1	207	46	51	236	224	21	73	78	88	96
213	222	DZA315.16	A17	97	135	93	166	25	118	53	230	74	80	89	98
217	87	240	paraggio	212	170	157	paraggio	246	30	113	paraggio	75	81	91	paraggio
groupe 12				groupe 3				groupe 6				groupe 9			

Semaine 7															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
29	54	143	13	100	108	142	152	9	66	18	7	70	17	203	109
45	57	60	14	101	116	144	159	10	194	141	234	235	83	42	200
214	125	2	15	105	127	147	160	102	79	140	131	215	6	26	56
241	225	12	paraggio	107	124	148	paraggio	63	110	119	paraggio	239	205	67	paraggio
groupe 7				groupe 10				groupe 1				groupe 4			
Semaine 8															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
19	27	38	58	168	182	190	201	49	8	226	186	61	48	155	55
20	31	40	69	169	64	191	206	154	99	229	211	164	39	187	36
23	32	44	71	11	184	193	208	4	62	111	3	188	115	162	50
24	35	47	paraggio	180	189	197	paraggio	77	158	196	paraggio	114	223	104	paraggio
groupe 8				groupe 11				groupe 2				groupe 5			
Semaine 9															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
72	76	84	95	209	219	231	243	33	5	59	136	86	65	128	43
73	78	88	96	210	220	232	244	92	1	207	46	51	236	224	21
74	80	89	98	213	222	DZA315.16	A17	97	135	93	166	25	118	53	230
75	81	91	paraggio	217	87	240	paraggio	212	170	157	paraggio	246	30	113	paraggio
groupe 9				groupe 12				groupe 3				groupe 6			
Semaine 10															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
70	17	203	109	29	54	143	13	100	108	142	152	9	66	18	7
235	83	42	200	45	57	60	14	101	116	144	159	10	194	141	234
215	6	26	56	214	125	2	15	105	127	147	160	102	79	140	131
239	205	67	paraggio	241	225	12	paraggio	107	124	148	paraggio	63	110	119	paraggio
groupe 4				groupe 7				groupe 10				groupe 1			
Semaine 11															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
61	48	155	55	19	27	38	58	168	182	190	201	49	8	226	186
164	39	187	36	20	31	40	69	169	64	191	206	154	99	229	211
188	115	162	50	23	32	44	71	11	184	193	208	4	62	111	3
114	223	104	paraggio	24	35	47	paraggio	180	189	197	paraggio	77	158	196	paraggio
groupe 5				groupe 8				groupe 11				groupe 2			
Semaine 12															
caméra 1				caméra 2				caméra 3				caméra 4			
86	65	128	43	72	76	84	95	209	219	231	243	33	5	59	136
51	236	224	21	73	78	88	96	210	220	232	244	92	1	207	46
25	118	53	230	74	80	89	98	213	222	DZA315.16	A17	97	135	93	166
246	30	113	paraggio	75	81	91	paraggio	217	87	240	paraggio	212	170	157	paraggio
groupe 6				groupe 9				groupe 12				groupe 3			

Annexe 3.2. Evolution de la température enregistrée par 4 sondes thermiques (Testo ; 177- T3) disposées sur les buvards disposés sous chacune des 4 caméras, le long du banc de germination.



Using an ecophysiological framework for characterizing germination and heterotrophic growth of several genotypes of *Medicago truncatula*

Germination and growth of heterotrophic stages are crucial steps for crop establishment. They highly depend on environmental conditions. The analytical framework provided by the emergence model SIMPLE (SIMulation of PLant Emergence) has been used for the characterization of *Medicago truncatula* (*M.tr.*) during the early stages of its cycle in response to seedbeds physical factors with major impacts on emergence: temperature, water potential, mechanical obstacles. *M.tr.* is a model species. It was chosen because of its breadth of naturally occurring diversity and the availability of nested core collections. These subsets of accessions aim at representing the genetic diversity of the species with a minimum of repetitiveness. Besides, the developing genetic and genomic tools provide promising outlooks to analyse the genetic determinism of traits in responses to the environmental factors studied.

The characterization we performed first, allowed us to establish the ecophysiological parameters values of *M.tr.*. Germination of *M.tr.* is fast but it is observed for narrow ranges of temperatures and water potentials. Similarly, the seedling elongation is fast, but occurred only in a limited range of temperatures. The force exerted by the seedling is rather low, as for other species with the same mass of seeds. We highlighted contrasting behaviours between genotypes. Genotypic variability was observed on germination time courses in response to extremes temperature, low and supra-optimal ones. Low temperatures also accentuated differences in maximum elongation in heterotrophic growth conditions. Responses to water stress during germination varied among genotypes. Differences in emergence forces were also observed between genotypes with contrasting seed masses.

In a second stage, we evaluated the extent of the effects of the genetic diversity on the germination and emergence by numerical experiments carried out with SIMPLE. The simulation results underlined the importance of the effects of mechanical obstacles and more generally of all the parameters allowing emergence time course to be accelerated. These results helped to set priorities of the analyses of genetic the determinism of parameters which variations cause the highest differences in emergence.

These results led to the selection of recombinant inbred lines (RIL) with contrasting parental genotypes behaviours on parameters. These parameters should be relevant to proceed towards the analyses of genetic determinism of characteristics with significant intra-specific variability. Finally, we carried out the analysis of the genetic determinism of the germination characteristics in response to supra-optimal temperatures. High-throughput phenotyping of a RIL population was performed. We identified QTL involved in the germination and early growth time courses variation at this temperature. Co-localizations of QTL were observed. They bring information on breeding strategies to undertake for the improvement these characteristics.

The present work contributes to the definition of relevant traits for the improvement of crop stand establishment under a wide range of environmental conditions. It also helps to detect chromosomal regions involved in their variations. It opens lanes for physiological analyses on differences explaining genotypic differences (role of sugar seed content on tolerance to water stress; changes in cell elongation at low temperatures) and hence, for the search of candidate genes.

KEY WORDS: *Medicago truncatula*, germination, emergence, temperature, water potential, mechanical obstacles, modeling, numerical experiments, genetic determinism, high-throughput phenotyping.

Caractérisation écophysologique de différents génotypes de *Medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe

RESUME

Les phases de germination et croissance hétérotrophe sont des étapes cruciales pour l'implantation d'une culture et dépendent fortement des conditions environnementales. Le cadre d'analyse fourni par le modèle de prévision des levées SIMPLE (SIMulation of PLant Emergence) a été utilisé pour la caractérisation de *Medicago truncatula* (*M.tr.*) au cours de ces étapes précoces de son cycle, en réponse à des facteurs physiques du lit de semences ayant des effets majeurs sur les levées : température, potentiel hydrique, obstacles mécaniques. *M.tr.* est une espèce modèle. Elle a été retenue en raison de son importante diversité naturelle et de l'existence d'une core collection, permettant d'avoir accès à une certaine diversité génétique en caractérisant un nombre limité de génotypes. Par ailleurs, la disponibilité d'outils de génétique et de génomique offre la perspective d'analyser le déterminisme génétique des réponses aux facteurs environnementaux étudiés.

La caractérisation menée nous a permis en premier lieu d'établir les valeurs des paramètres écophysologiques de *M.tr.*. La germination de *M.tr.* est rapide mais elle ne s'observe que dans des gammes de températures et de potentiels relativement étroites. De même, l'allongement est rapide, mais se réalise dans une gamme de températures restreinte. La force exercée par la plantule face aux obstacles mécaniques est relativement faible, ce qui la rapproche de celles d'espèces de même masse de semences. Nous avons mis en évidence des comportements contrastés entre génotypes. Cette variabilité génotypique porte sur la vitesse de germination aux températures extrêmes, basses et supra-optimales. Les basses températures exacerbent aussi les différences d'allongement maximum atteint en conditions de croissance hétérotrophe. La réponse au déficit hydrique est variable selon les génotypes étudiés. Enfin, des différences de force d'émergence ont aussi été observées entre génotypes.

Dans une seconde étape, nous avons évalué par expérimentations numériques réalisées avec SIMPLE, l'ampleur des effets de la variabilité génétique mise en évidence. Les résultats des simulations soulignent l'importance des effets des obstacles mécaniques et d'une manière générale de tous les paramètres permettant d'accélérer la vitesse d'arrivée à la surface. Ils ont ainsi permis d'établir des priorités d'étude du déterminisme génétique des paramètres dont les variations sont à l'origine de différences à la levée.

L'ensemble de ces résultats oriente le choix de populations de lignées recombinantes (LR) issues des parents aux comportements contrastés sur des variables ou paramètres jugés pertinents, pour aborder l'analyse du déterminisme génétique de caractères présentant une importante variabilité intra-spécifique. Aussi, dans une troisième étape, nous avons abordé l'analyse du déterminisme génétique de caractères décrivant la germination, en réponse à des températures supra-optimales. Le phénotypage haut débit d'une population de LR a permis d'identifier des QTL impliqués dans la variation des vitesses de germination et de début de croissance. L'analyse des co-localisations de QTL apporte des informations sur les stratégies d'amélioration à envisager pour la sélection d'un ou plusieurs de ces caractères.

Les connaissances issues de ces travaux contribuent à la définition de caractères susceptibles d'être améliorés pour favoriser l'implantation des cultures dans différentes conditions de semis, et à l'identification des zones chromosomiques impliquées. Elles ouvrent aussi des pistes d'études physiologiques expliquant des différences de comportements observés pour les différents génotypes (rôle de la composition en sucres de la graine sur la tolérance au stress hydrique ; modifications de l'allongement cellulaire à basses températures) et oriente ainsi la recherche de gènes candidats dans les zones chromosomiques impliquées.

MOTS CLEFS : *Medicago truncatula*, germination, levée, température, potentiel hydrique, obstacles mécaniques, modélisation, expérimentation numérique, déterminisme génétique, phénotypage haut débit.