

Génétique moléculaire de la floraison chez le cerisier doux : étude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la floraison chez le cerisier (Prunus avium) en vue de son adaptation aux futures conditions climatiques.

Sophie Castede

▶ To cite this version:

Sophie Castede. Génétique moléculaire de la floraison chez le cerisier doux : étude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la floraison chez le cerisier (Prunus avium) en vue de son adaptation aux futures conditions climatiques.. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0312 . tel-01212887

HAL Id: tel-01212887 https://theses.hal.science/tel-01212887

Submitted on 7 Oct 2015

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.



THÈSE PRESENTEE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Spécialité : Génétique

Par Sophie CASTÈDE

GENETIQUE MOLECULAIRE DE LA FLORAISON CHEZ LE CERISIER DOUX

Etude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la floraison chez le cerisier (*Prunus avium*) en vue de son adaptation aux futures conditions climatiques



Soutenue le 11 Décembre 2014

Membres du jury :

M. HERNOULD, Michel, Professeur, Université de BordeauxPrésidentMme ADAM-BLONDON, Anne- Françoise, Directrice de Recherche, INRA VersaillesRapporteurMme FAIVRE-RAMPANT, Patricia, Chargée de Recherche, INRA EvryRapporteurM. BONHOMME, Marc, Ingénieur de Recherche, INRA Clermont Ferrand-TheixExaminateurM. KELNER, Jean-Jacques, Maître de Conférences, Montpellier SupAgroExaminateur

Directrice de thèse

Mme DIRLEWANGER Elisabeth, Directrice de Recherche, INRA Bordeaux

i

Remerciements

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans le soutien financier du méta-programme ACCAF et du Conseil Régional d'Aquitaine sous la présidence de Monsieur Alain ROUSSET, ainsi que la confiance et la patience de ma Directrice de Recherche Madame Elisabeth DIRLEWANGER qui m'a accueillie au sein de son équipe pendant ces années de thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son encadrement, ses conseils et son soutien.

Mes plus sincères remerciements vont à Monsieur le Professeur Michel HERNOULD qui m'a fait l'honneur d'être mon référent avec l'école doctorale, pour la justesse de son jugement, pour tous ses judicieux conseils, et dont l'enseignement et la passion resteront des exemples pour moi.

Je remercie vivement Madame la Directrice de Recherche Anne- Françoise ADAM-BLONDON et Madame la Chargée de Recherche Patricia FAIVRE-RAMPANT de l'honneur qu'elles m'ont fait en acceptant la charge de rapporteur de ma thèse.

Je remercie Monsieur l'Ingénieur de Recherche Marc BONHOMME et Monsieur le Maître de Conférences Jean-Jacques KELNER qui ont eu la gentillesse d'accepter de juger mon travail.

Ce travail a bénéficié de la patience et des compétences de l'équipe de l'unité expérimentale Arboricole (UEA) de l'INRA de Bordeaux et de celle de la Plateforme Génome Transcriptome (PGTB) du centre de génomique fonctionnelle de Bordeaux à Cestas-Pierroton, qui m'ont accueillie tant de fois avec gentillesse et bonne humeur.

Merci à ceux qui étaient mes collègues mais sont aujourd'hui des amis précieux. Ces personnes exceptionnelles se reconnaîtront car elles m'ont inlassablement encouragée, supportée et soutenue dans mes moments d'enthousiasme étincelant comme dans les moments de doute inconsolable.

Merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à mon travail, je ne les oublie pas. La réalisation de cette thèse de doctorat n'aurait jamais été possible sans leur contribution. Merci!

Enfin, je dédie cette thèse à mes proches, mes amis, qui m'ont soutenue et supportée durant ces trois années.

Productions scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture

- **Castède S**, Campoy JA, Quero-García J, Le Dantec L, Lafargue M, Barreneche T, Wenden B and Dirlewanger E (2014). Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. New Phytologist 202(2); 703-715.

- **Castède S**, Wenden B, Campoy JA, Le Dantec L, Barreneche T, Quero-García J and Dirlewanger E (2014). Mapping and expression analyses of candidate genes involved in Sweet cherry (*Prunus avium*) flowering. En cours de soumission.

Communications

- **Castède S**, Campoy JA, Le Dantec L, Quero-García José, Rosyara UR, Iezzoni A, <u>Dirlewanger</u> <u>E</u>. "Genetic determinism and candidate genes for flowering date – a phenological trait highly affected by climate change in sweet cherry". Plant and Animal Genome XX conference, du 14 au 18 Janvier 2012, San Diego – Californie, USA (**présentation orale**, Session: Climate Change and ICRCGC).

- **Castède S**, Campoy JA, Lafargue M, Quero-García J, Le Dantec L, Wenden B, Dirlewanger E. "Genetic determinism and candidate genes for chilling requirement and flowering date in sweet cherry (Prunus avium)". 6th Rosaceous genomics conference, du 30 Septembre au 4 Octobre 2012, Mezzocorona – Palarotari, Italie (**Poster**, Session: Plant Genetics).

- **Castède S**, Campoy JA, Quero-García J, Joly J, Lafargue M, Le Dantec L, Wenden B, Dirlewanger E. "QTL detection of important traits in sweet cherry (Prunus avium): chilling and heat requirement and flowering date". 7th International Cherry Symposium, du 23 au 27 Juin 2013, Plasencia, Espagne (**Poster**, Session: S1 – Breeding, Genetics and Biotechnology).

- **Castède S**, Le Dantec L, Campoy JA, Quero-García J, Wenden B, Dirlewanger E. "Candidate genes involved in flowering pathway in sweet cherry (Prunus avium)". 7th International Cherry Symposium, du 23 au 27 Juin 2013, Plasencia, Espagne (**Poster**, Session: S1 – Breeding, Genetics and Biotechnology).

- <u>Castède S</u>, Campoy JA, Quero-García J, Le Dantec L, Lafargue M, Barreneche T, Wenden B, Dirlewanger E. "Genetic determinism of chilling and heat requirements and flowering date, three phenological traits highly affected by climate change in sweet cherry". Plant and Animal Genome XXII conference, du 11 au 15 Janvier 2014, San Diego – Californie, USA (**présentation orale**, Session: Fruit/Nuts).

- **Castède S**, Le Dantec L, Campoy JA, Quero-García J, Wenden B, Dirlewanger E. "Analysis of candidate genes involved in flowering date in sweet cherry (Prunus avium)". 7th Rosaceous genomics conference. Seattle – Washington, USA, du 24 au 26 Juin 2014. (**Poster**, Session: Genomics to Genetics).

Résumé

Etude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la floraison chez le cerisier doux (*Prunus avium*)

Chez les espèces fruitières, la floraison est un évènement majeur qui influencera fortement la fructification. Ce processus, finement régulé par de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, est encore peu connu. Chez le cerisier doux (Prunus avium), les fleurs ne s'épanouissent qu'après avoir satisfait des besoins en froid et en chaud. Les effets du changement climatique sur la floraison sont déjà notables et pourraient induire d'importantes pertes économiques. La compréhension des déterminants génétiques et moléculaires impliqués dans la floraison permettra l'amélioration des programmes de sélection variétale visant l'obtention d'arbres adaptés aux futures conditions climatiques. L'objectif de cette thèse est d'accroître les connaissances sur ces déterminants et d'identifier les gènes contrôlant la floraison chez le cerisier. En étudiant les deux familles intra spécifiques 'Regina' \times 'Lapins' et 'Regina' × 'Garnet', la détection de nombreux quantitative trait loci (QTL) sur l'ensemble des groupes de liaisons (GL) a permis de confirmer la forte implication des besoins en froid dans la floraison ainsi que la complexité de ces caractères. Un QTL à effet majeur a été localisé sur le GL4. Dans les régions couvertes par les QTL contrôlant la date de floraison, une centaine de gènes candidats (GC) pour ce caractère a été identifiée. Un sous ensemble de ces GC a ensuite été étudié pour leur expression au cours du développement des bourgeons par PCR quantitative (qPCR). A terme, ces travaux serviront de bases pour l'identification et la sélection de gènes qui permettront l'obtention de génotypes adaptés aux futures conditions climatiques.

Mots clés :

Gène candidat, QTL, besoins en froid, changements climatiques, dormance, expression de gènes, floraison, *Prunus avium*

UMR 1332 – Biologie du fruit et Pathologie (BFP)

Equipe : Adaptation du cerisier aux changements climatiques 71 avenue Édouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon

v

Abstract

Study and understanding of the genetic and molecular determinism of flowering in sweet cherry (*Prunus avium*)

In fruit species, the flowering is a major event which strongly influences fructification. This process tiny controlled by many genetic and environmental factors is still little known. In sweet cherry (Prunus avium), flowers open out only after having satisfied chill and heat requirements. The effects of climate change on the flowering are already notable and could induce important economic losses. Identification of genetic and molecular determinants involved in the flowering will allow the improvement of varietal selection programs to obtain trees adapted to future climate conditions. Objective of this thesis is to increase the knowledge of these determinants and identify genes involved in flowering in sweet cherry. By studying two intraspecific progenies 'Regina' × 'Lapins' and 'Regina' × 'Garnet', detection of many quantitative trait loci (QTL) on all linkage groups (LG) has enabled us to confirm the strong involvement of chill requirements in the flowering as well as the complexity of these traits. QTL with major effect was localized on the LG4. In regions covered by all the QTLs controlling flowering date, a hundred candidate genes (CG) for this trait was identified. A subset of these GC was then studied for their expression during development of buds by quantitative PCR (qPCR). In the long term, this work will serve as a basis for the identification and selection of genes that allow obtaining genotypes adapted to future climate conditions.

Keywords :

Candidate gene, QTL, chill requirements, climate change, dormancy, gene expression, flowering, *Prunus avium*

UMR 1332 – Biology of fruit and Pathology (BFP)

Team : Adaptation of Cherry to Climate Change 71 avenue Édouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon

Résumé	iv
Abstract	vi
Sommaire	viii
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xiv
Liste des annexes	xiv
Liste des abréviations	xvi
Introduction générale	3
Chapitre I. Synthèse bibliographique	9
I. Les changements climatiques	9
I.1. Au niveau mondial	9
I.2. En France métropolitaine	11
I.3. Impacts du changement climatique	13
II. Le cerisier	17
II.1. Origine et domestication	17
II.2. Taxonomie	19
II.2.1. Famille des <i>Rosaceae</i>	19
II.2.2. Genre <i>Prunus</i>	21
II.2.3. Sous-genre <i>Cerasus</i>	21
II.3. Le cerisier : une plante d'intérêt agronomique	27
II.3.1. La production de la cerise	27
II.3.2. Une plante exigeante	29
II.3.3. L'amélioration variétale du cerisier doux	31
II.4. Caractéristiques biologiques du cerisier	33
II.4.1. Développement végétatif	35
II.4.2. De la floraison à la fructification	35
II.4.3. Cycle phénologique de la floraison	39
II.4.4. Impact du réchauffement climatique sur la phénologie de la floraison	41
II.5. Ressources disponibles chez le cerisier	41
II.5.1. Centre de Ressources Génétiques Prunus	41
II.5.2. Ressources génomiques	43
II.5.2.1. Le génome du cerisier	43
II.5.2.2. Transcriptomique cerisier	45
II.5.2.3. Puce à ADN 'RosBREED 6K Cherry SNP'	47
	viii

Sommaire

II.5.2.4. Cartes de liaisons génétiques	47
II.5.2.5. Déterminisme génétique de caractères complexes	49
III. La floraison	51
III.1. La floraison chez les annuelles : cas d'Arabidopsis	53
III.1.1. La voie de la réponse à la photopériode.	53
III.1.2. La voie de la réponse à la température	57
III.1.2.1. La vernalisation	57
III.1.2.2. Le rôle de la température ambiante	61
III.1.3. Les autres voies de signalisation	63
III.1.3.1. La voie autonome	63
III.1.3.2. La voie des gibbérellines	65
III.1.3.3. Les autres voies endogènes	65
III.1.4. Intégration des différentes voies	67
III.2. La conservation des voies de signalisation chez les pérennes	69
III.3. Voies de signalisation chez les <i>Rosaceae</i>	73
IV. Présentation de la thèse	75
IV.1. Un enjeu scientifique et socio-économique	75
IV.2. Objectifs et hypothèses de travail	77
Chapitre II. Matériel et Méthodes	81
I. Matériel végétal	81
I.1. Familles étudiées	81
I.2. Matériel végétal étudié	83
II. Caractères étudiés	83
II.1. Besoins en froid	83
II.2. Besoins en chaleur	87
II.3. Date de floraison	87
III. Analyses moléculaires	87
III.1. Extraction d'ADN	87
III.2. Extraction d'ARN totaux	89
III.3. Définition des amorces	91
III.4. Séquençage de l'ADN	91
III.5. Étude d'expression en qPCR	93
III.5.1. Réaction de transcription inverse	93
III.5.2. PCR quantitative	95
III.5.3. Normalisation des niveaux d'expression	97
III.5.4. Optimisation du protocole de qPCR	99
III.5.4.1. Choix des échantillons à analyser	99

III.5.4.2. Choix des gènes de références	
IV. Analyses génétiques	
IV.1. Analyses statistiques	
IV.2. Réalisation de cartes génétiques	
IV.2.1. Génotypage	
IV.2.2. Construction de la carte génétique	
IV.3. Cartographie des gènes candidats	
IV.3.1. Détection du polymorphisme	
IV.3.2. Génotypage et cartographie	
IV.4. Détection de QTL	
Chapitre III. Résultats	
I. Déterminisme génétique de la floraison	
I.1. Introduction	
I.2. Publication 1	
I.3. Résultats complémentaires	
II. Déterminisme moléculaire de la floraison chez le cerisier	
II.1. Introduction	
II.2. Publication 2	
Chapitre IV. Discussion et Conclusion	
I. Contrôle génétique	
II. Contrôle moléculaire	
III. Conclusion et perspectives	
Bibliographie	
Annexes	

Liste des figures

Figure 1. Projection des changements de température de surface (°C/°C) (A) et de précipitations (%/°C) (B) au niveau mondial relativement à la référence 1986-2005 pour la fin du 21ème (en haut) et le 22ème (en bas) siècles (Collins et al., 2013)8
Figure 2. Evolution de la température en moyenne sur la France (°C) en hiver (à gauche) et en été (à droite), relativement à la référence 1976-2005 (Ouzeau et al., 2014) 10
Figure 3. Ecarts des températures hivernales (°C) en France relativement à la référence 1976- 2005, pour le scénario RCP8.5, aux horizons 2021-2050 (Ouzeau et al., 2014)10
Figure 4. Evolution des précipitations en moyenne sur la France (°C) en hiver (à gauche) et en été (à droite), relativement à la référence 1976-2005 (Ouzeau et al., 2014)
Figure 5. Ecarts des précipitations estivales (mm/jour) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8,5, aux horizons 2021-2050 (en haut) et 2071-2100 (en bas) (Ouzeau et al., 2014)12
Figure 6. Impact des changements climatiques à échelle mondiale (IPCC, 2014) 14
Figure 7. Topographie du lit du Glacier de Thwaites (Joughin et al., 2014)
Figure 8. Fruit double résultant de températures élevées durant l'été de l'année précédente (Charlot, 2008)
Figure 9. Classification de la famille des Rosaceae selon Potter et al. (2007)18
Figure 10. Famille des Rosaceae, divisée en trois sous- familles (Rosoidae, Dryadoideae, Spiraeoidae) selon la classification selon Potter et al. (2007)
Figure 11. Classification du genre Prunus selon Rehder (1949)20
Figure 12. Différents organes du cerisier doux (Prunus avium) et du cerisier acide (Prunus cerasus)
Figure 13. Caractéristiques des différents types de cerises
Figure 14. Relations entre les espèces de la section Eucerasus (Tavaud, 2002)23
Figure 15. Différences morphologiques entre le cerisier doux (Prunus avium), le cerisier intermédiaire (Prunus x gondouinii) et du cerisier acide (Prunus cerasus) (Perez et al., 2010)
Figure 16. Différents organes de Prunus mahaleb L. (Borzan, 2001)25
Figure 17. Répartition de la production moyenne de cerises au niveau mondial (D'après Monfreda et al. (2008) actualisé par l'institut sur l'environnement, Unniversité du minnesota, USA)
Figure 18. Répartition de la production moyenne de cerises au niveau européen (FAOSTAT, 2014)
Figure 19. Répartition géographique de la production française de cerises douces (AOP Cerises, 2014)
Figure 20. Bouquet de mai
Figure 21. Rameaux de cerisier
Figure 22. Système d'auto-incompatibilité gamétophytique

Figure 23. Cycle phénologique du cerisier
Figure 24. Stades phénologiques du cerisier (Lichou et al., 1990)
Figure 25. Cycle phénologique du cerisier perturbé par l'élévation des températures40
Figure 26. Etapes phénologiques dans l'élaboration de la floraison du cerisier perturbées par l'élévation des températures (Legave, 2008)40
Figure 27. Observation des impacts dus à l'élévation des températures au niveau des fleurs de cerisier (Charlot, 2008)40
Figure 28. Collection « INRA » pêcher, Collection nationale prunier et Collection nationale cerisier
Figure 29. Diversité observée au sein des collections
Figure 30. Schématisation de la réalisation du catalogue de gènes exprimés chez le cerisier (Le Dantec et al., 2012)
Figure 31. Voies de signalisation de la floraison chez Arabidopsis (Srikanth & Schmid, 2011).
Figure 32. Modèle de coïncidence externe: Réponse de la floraison à la photopériode chez les plantes de jours longs (Imaizumi & Kay, 2006)54
Figure 33. Horloge circadienne chez Arabidopsis (Fogelmark & Troein, 2014)
Figure 34. Rythmes circadiens de CO chez Arabidopsis en jours courts (à droite) ou jours longs (à gauche), et leur coïncidence avec la lumière ambiante (A, B) ou le rythme de GI (C, D) (Yeang, 2013)
Figure 35. Changements dynamiques de la chromatine au niveau du gène FLC durant la vernalisation (Pyo et al, 2014)
Figure 36. Régulation du cycle de développement chez Arabidopsis par les différents complexes PRC2 (Butenko, 2011)
Figure 37. Régulation de FLC par la vernalisation et la voie autonome (Srikanth & Schmid, 2011)60
Figure 38. Régulation de la floraison par la température ambiante au cours des jours longs (en haut) et des jours courts (en bas) (Capovilla et al, 2014)
Figure 39. Voie des gibbérellines (Galvão & Schmid, 2014)
Figure 40. Mécanismes de régulation de la floraison et de la dormance des bourgeons (Horvath 2009)70
Figure 41. Comparaison des voies de régulation de la floraison (Kurokura et al, 2013)72
Figure 42. Cycle PCR en présence de SYBR® Green94
Figure 43. Analyse de l'expression du gène de référence ACT
Figure 44. Analyses des données de génotypages en utilisant le logiciel GenomeStudio 100
Figure 45 Séquences visualisées avec BioEdit 102
Figure 46. Principe de la méthode de génotypage Sequenom iPLEX Gold par extension d'amorces et spectrométrie de masse

Liste des tableaux

Tableau 1. Les nouveaux scénarios RCP (Representative Concentration Pathway) du GIE	EC
(Moss et al., 2010).	.9
Tableau 2. Ecarts des températures par rapport à la moyenne de référence 1976-2005, pochacun des modèles et scénarios, en moyenne aux horizons 2021-2050 et 2072100 (Ouzeau et al., 2014)	ur 1- 11
Tableau 3. Ecarts des précipitations par rapport à la référence moyenne 1976-2005 (dmm/jour), pour chacun des modèles et scénarios, en moyenne aux horizons 2022050 et 2071-2100 (Ouzeau et al., 2014).	en 1- 13
Tableau 4. Groupes d'incompatibilité et génotypes de l'allèle S pour les variétés de ceris	es
douces les plus cultivées (Dirlewanger et al., 2007).	36
Tableau 5. Composition de la collection de ressources génétiques Cerisier	43
Tableau 6. Données du séquençage du génome du cerisier (Carrasco et al., 2013)	43
Tableau 7. Cartes génétiques du cerisier doux	46
Tableau 8. QTL détectés chez le cerisier doux	48
Tableau 9. Prélèvements de bourgeons floraux pour les analyses d'expression	82
Tableau 10. Détection « 2QTL » pour les besoins en froid (CR), les besoins en chaud (HR)	et
ia date de instatson (1D) dans la descendance $K \wedge O$	50

Liste des annexes

Annexe 1. Programme classique d'obtention d'une nouvelle variété de cerisier	. 241
Annexe 2. Échelle internationale BBCH (Meier et al., 1994)	. 243
Annexe 3. Liste des gènes répertoriés au cours de cette étude	. 245

Préparation de la soutenance	Préparation de la soutenance	;	250
------------------------------	------------------------------	---	-----

Liste des abréviations

Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Aladin	Aire Limitée Adaptation dynamique Développement InterNational
ARN	Acide RiboNucléique
ARMm	ARN messager
ANOVA	ANalysis Of Variance, Analyse de variance
BLAST	Basic Local Alignment Searching Tool
Blastn	Basic Local Alignment Searching Tool nucleotide
cM	centiMorgan
dNTP	Désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
GDR	Banque de données sur les Rosaceae (Genome Database of Rosaceae)
GIEC	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (Intergovernemental Panel on Climate Change, IPCC)
GWA	Genome-wide association
h2	Héritabilité
Ln	Logarithme Népérien
Log	Logarithme
LOD	Logarithm of the Odds, logarithme de vraisemblance
MIM	Multiple Interval Mapping
ORF	Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	PolyVinylPyrrolidone
qPCR	PCR quantitative (ou en temps réel)
QTL	Quantitative Trait Locus
\mathbb{R}^2	Pourcentage de Variance Phénotypique Expliqué
RT	Reverse Transcription
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
TAIR	Banque de données sur Arabidopsis (The Arabidopsis Information Resource)
TEA	Tris Acetat EDTA.
Tm	Melting Temperature
UTR	UnTranslated Region, région non traduite
χ2	Khi-deux
WRF	Weather Research and Forecasting

Liste des gènes

ABH1	Aba Hypersensitive 1	GH17	Glycosyl Hydrolases
ARP4	Actin-Related Protein 4	GI	Gigantea
BRI1	Brassinosteroid Insensitive 1	HYL1	Hyponastic Leaves 1
CAC	Chloroplastic Acetylcoenzyme A	KS	Kaurene Synthase
~	Carboxylase 1	LDL1	Lysine-specific Demethylase 1
CAL CLF	Calmodulin binding protein Curly Leaf	LDL2	Lysine-specific Demethylase 1- Like 2
COL2	Constans-Like 2	LHP1	Like Heterochromatin Protein 1
COP1	Constitutive Photomorphogenic 1	LHY	Late elongated Hypocotyl
CRP	Cryptic Precocious	MBF1A	Multiprotein Bridging Factor 1A
DAM1 à 6	Dormancy Associated Mads-box	MBF1C	Multiprotein Bridging Factor 1C
	1 à 6	MMP	Matrix Metalloproteinase
DDF1	Dwarf and Delayed Flowering 1	MSI1	Multicopy Supressor of Ira 1
DDL	Dawdle	NUA	Nuclear Pore Anchor
ELF3	Early Flowering 3	PIE1	Photoperiod-Independent Early
ELF7	Early Flowering 7		flowering 1
ELF8	Early Flowering 8	OTS1	Overly Tolerant to Salt 1
EMF2	Embryonic Flower 2	PHYC	Phytochrome C
ESD4	Early in Short Days 4	PRR7	Pseudo-Response Regulator 7
FAR1	Far-red impaired response 1	PRR9	Pseudo-Response Regulator 9
FCA		REF6	Relative of Early Flowering 6
FIE2	Fertilization-Independent	SAR3	Suppressor of Auxin Resistance 3
	Endosperm	SDG2	Set Domain-containing protein 2
FIO1	Fional	SDG26	Set Domain Group 26
FKF1	Flavin-binding, Kelch repeat, F box 1	SOC1	Suppressor of Overexpression of CO 1
FLD	Flowering Locus D	SPA1	Suppressor of PHYA-105 1
FL2/LFY	Floricaula / Leafy homolog 2	SUF4	Suppressor of Frigida 4
FRI	Frigida		
FRS5	Far1-Related Sequence 5	SVP	Short Vegetative Phase
FRS6	Far1-Related Sequence 6	SWN	Swinger
FRS8	Far1-Related Sequence 8	TUB	Tubulin Beta chain 2
FT	Flowering locus T	VEL1	Vernalization5/VIN3-Like
FYPP3	Flower-specific, Phytochrome- associated Protein Phosphatase 3	VIL1	VIN3-Like 1
GA2ox	Gibberellin 2-oxidase	VIM1	Variant In Methylation 1
GA20ox	Gibberellin 20-oxidase	VRN1	Vernalization 1
GCR1	G-protein-Coupled Receptor 1	VRN2	Vernalization 2

Introduction générale

Introduction générale

Ces dernières années, le changement climatique est devenu une certitude et présente déjà des impacts visibles. Il se traduit notamment par une élévation de température en automne et en hiver (IPCC, 2013). Chez de nombreuses espèces pérennes, il a été démontré qu'une élévation de température pendant les périodes de dormance et de sortie de dormance (automne, hiver) était responsable 1) d'avancées des dates de floraison entraînant une augmentation du risque de gelées, 2) de désordres phénologiques avec un étalement important des dates de floraison, 3) d'une plus difficile synchronisation de la floraison avec l'activité des pollinisateurs et 4) d'une modification des relations hôte/pathogène (Hanninen & Tanino, 2011; Luedeling, 2012). La longévité et la longueur des intervalles de génération propres à un grand nombre d'espèces pérennes, notamment fruitières, les situent dans une position extrêmement précaire lorsque des changements environnementaux se produisent rapidement.

Face à ces changements climatiques, deux options sont possibles pour maintenir les productions fruitières pérennes : 1) les zones de productions devront être déplacées en fonction des prévisions climatiques futures, 2) de nouvelles variétés adaptées à ces nouvelles conditions devront être implantées dans les régions actuelles de production. Ceci pourrait être le cas du cerisier doux (Prunus avium), très sensible au réchauffement climatique. La production française de cerise, atteint environ 55 000 T depuis plus de 10 ans avec toutefois de grandes variations annuelles dues aux accidents climatiques (2,8 T/ha produites en 1998 au lieu 5 T/ha produites en moyenne en France) (FAOSTAT, 2014). Cette production, bien que modeste comparée à d'autres productions telles que celle du pêcher ou du pommier, reste très importante pour l'économie de certaines régions, notamment dans le Pays Basque à Itxassou où une dynamique de relance des variétés locales s'est développée ces dernières années. Par ailleurs, les conditions climatiques futures vont mettre particulièrement en danger les bassins actuels de production de cerise dans le sud-est, région où l'augmentation des températures devrait être encore plus marquée que dans le sud-ouest (Ouzeau et al., 2014). En conséquence, il devient indispensable d'étudier les mécanismes d'adaptation au changement climatique dans le but, à terme, d'implanter de nouvelles variétés qui seront dans les conditions de production optimales dans les cinquante prochaines années. Parmi ces mécanismes, ceux impliqués dans la floraison ont une importance capitale.

La floraison est une étape cruciale dans la pérennisation d'une plante. Elle est une transition entre un état végétatif où la plante va croitre et un état reproductif où elle produira des fruits.

Le bon déroulement de cette transition conditionnera le rendement et la qualité de la fructification. Chez les plantes annuelles, cette transition unique sera primordiale pour la survie de l'espèce. Chez les plantes pérennes cultivées, la concordance des cycles végétatifs et floraux avec des conditions climatiques favorables, va conditionner chaque année leur production. Chez ces espèces, la phénologie de la floraison est sous la dépendance directe d'une sortie adéquate de dormance des bourgeons. La dormance est une période de repos déclenchée par la baisse de la température et par la diminution de la photopériode, qui peut se décomposer en endodormance et écodormance (Lang, 1987). La levée de l'endodormance nécessite une accumulation suffisante de températures froides pour satisfaire les besoins en froid, suivie de l'écodormance qui requiert des températures suffisamment élevées pour satisfaire les besoins en chaleur et permettre la croissance du bourgeon puis la floraison. Dans le contexte du changement climatique, la levée de l'endodormance de certaines espèces et dans certaines régions de l'hémisphère Nord devient critique en particulier suite à des hivers plus doux (Menzel, 2000; Chmielewski & Rotzer, 2001).

Les mécanismes impliqués dans la floraison ont été particulièrement étudiés chez *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) (Horvath, 2009; Amasino, 2010; Higgins *et al.*, 2010) et plusieurs plantes pérennes telles que le peuplier (Hsu *et al.*, 2006; Rinne *et al.*, 2011). Un réseau génétique complexe permettant un contrôle fin de la floraison grâce à l'intégration de signaux endogènes et exogènes a été mis en évidence. Ce contrôle assure la synchronisation de la floraison avec les conditions environnementales optimales à son aboutissement. Toutefois, ces mécanismes restent encore mal définis, en particulier chez les espèces pérennes.

Cette thèse portera sur le cerisier doux (*Prunus avium*), choisi ici comme modèle d'étude en raison de sa grande vulnérabilité face au réchauffement climatique. <u>L'objectif principal de cette thèse sera la caractérisation de déterminants génétiques et moléculaires impliqués dans la floraison chez cette espèce</u>. Cet objectif se déclinera en trois questions scientifiques :

(1) Quelles sont les régions du génome impliquées dans la variation de caractères possiblement affectés par les changements climatiques, 'besoins en froid', 'besoins en chaud' et 'dates de floraison', et sont-elles conservées chez les *Prunus* ?

(2) En se basant sur l'hypothèse de la conservation des acteurs de la floraison décrits chez d'autres plantes telles qu'*Arabidopsis*, peut-on identifier des gènes candidats majeurs qui co-localisent avec les régions impliquées dans la floraison chez le cerisier ?

(3) Est-ce que ces gènes candidats sont bien impliqués dans la variation des caractères étudiés?

Pour répondre à ces questions, trois caractères déterminants de la phénologie de la floraison seront étudiés: les besoins en froid, les besoins en chaud ainsi que la date de floraison. Les besoins en froid et en chaud seront étudiés dans la famille F_1 intra-spécifique 'Regina' × 'Garnet' (R × G), alors que la date de floraison sera étudiée dans deux fonds génétiques R × G et 'Regina' × 'Lapins' (R × L).

Ce manuscrit commencera par une synthèse bibliographique, premier chapitre, qui présentera les changements climatiques et leurs impacts, puis le modèle d'étude le cerisier doux, ensuite elle rappellera le processus de floraison et enfin exposera la démarche scientifique suivie. Dans un second chapitre, le matériel et les méthodes utilisés seront décrits. Le troisième chapitre présentera les résultats et le quatrième chapitre présentera la discussion des résultats obtenus et les perspectives à envisager suite à cette étude.

Synthèse bibliographique



Figure 1. Projection des changements de température de surface (°C/°C) (A) et de précipitations (%/°C) (B) au niveau mondial relativement à la référence 1986-2005 pour la fin du 21ème (en haut) et le 22ème (en bas) siècles (Collins et al., 2013).

Cette projection prend en compte toutes les simulations disponibles pour chaque scénario RCP. L'échelle de couleur représente le gain de degrés Celsius (A) ou de pourcentage de précipitation (B) pour 1°C de variation de température moyenne mondiale. Les moyennes zonales pour chaque modèle sont indiquées à droite en bleu pour RCP2.6, bleu clair pour RCP4,5, orange pour RCP6.0 et rouge pour RCP8.5.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I. Les changements climatiques

I.1. Au niveau mondial

L'évolution du climat est marquée par d'importants changements au niveau planétaire. Parmi ces changements, on retrouve la variation de la température et de la pluviométrie. Le dernier rapport du Groupe Intergouvernemental d'experts sur l'Evolution du Climat (GIEC) prévoit plusieurs scénarios possibles (**Tableau 1**).

Tableau 1. Les nouveaux scénarios RCP (Representative Concentration Pathway) du GIEC (Moss *et al.*, 2010).

Désignation	Forçage radiatif ¹	Concentration ² (ppm)	Forme du profil
RCP 8.5	>8,5W.m-2 en 2100	>1370 eq-CO2 en 2100	Hausse
PCD 6 0	~6W.m-2 au niveau de	~850 eq-CO2 au niveau de	Stabilisation sans
KCF 0.0	stabilisation après 2100	stabilisation après 2100	dépassement
PCD 4 5	~4,5W.m-2 au niveau de	~660 eq-CO2 au niveau de	Stabilisation sans
KCF 4.3	stabilisation après 2100	stabilisation après 2100	dépassement
$P(\mathbf{D}^{2}) \in (\mathbf{D}^{2} \mathbf{D}^{2} \mathbf{D}^{3})$	Pic à ~3W.m-2 avant 2100	Pic ~490 eq-CO2 avant 2100	Die puis déclip
CF 2.0 (RCF 3 - FD)	puis déclin	puis déclin	r ic puis decini

¹ Les valeurs approximatives du forçage radiatif correspondent à ± 5 % du niveau indiqué en W/m². Le forçage radiatif englobe l'effet net de tous les gaz à effet de serre anthropiques et autres agents de forçage.

² concentrations approximatives d'équivalent-CO2 (équiv.-CO2), obtenues par la formule : [Conc. = 278 * exp(forçage/5,325)].

³ PD = pic suivi d'un déclin

Pour tous ces scénarios, un consensus tend à affirmer que ces changements résultent en grande partie des activités humaines dont l'émission de gaz à effet de serre tel que les émissions carbone. Le taux annuel d'augmentation de ces émissions est passé de 1.1% dans les années 90 à 3% durant la période de 2000 à 2005 (Raupach *et al.*, 2007; Le Quere *et al.*, 2010; Raupach *et al.*, 2010). En prenant en compte les différents scénarios, une augmentation de 0,3 à 0,7°C de la température est prévue pour la moitié du XXI^{ème} siècle avec des variations propres à chaque région du globe (Kirtman *et al.*, 2013). Avec le scénario moyen RCP 4.5, une augmentation de température de 2.6°C est prévue pour les années 2081-2100. Avec un scénario plus extrême (RCP 8.5), cette augmentation pourrait atteindre 4.8°C (**Figure 1A**) (Collins *et al.*, 2013). Pour les océans, une élévation de température de l'ordre de 0.6 à 2°C sur les 100 premiers mètres et de 0.3°C à 0.6°C au-delà de 100m est estimée pour la fin du XXI^{ème} siècle (Collins *et al.*, 2013). Cette augmentation et le rôle de tampon des océans n'étaient pas jusqu'alors pris en compte dans les scénarios actuels. Ceci pourrait encore aggraver les scénarios futurs.





Les moyennes d'ensemble de chaque scénario RCP (lignes continues, RCP2.6 en bleu, RCP4.5 en vert et RCP8.5 en rouge) sont accompagnées de leurs dispersions (enveloppes colorées correspondant à l'intervalle 5 %-95 % de l'ensemble). La courbe noire représente la moyenne d'ensemble des simulations « historiques » de CMIP5 (de 1950 à 2005), et l'enveloppe colorée associée la dispersion de cet ensemble. Les lignes discontinues et pointillées correspondent aux évolutions respectives pour les simulations Aladin-Climat et WRF. Les diagrammes en boîte donnent les distributions moyennes sur la période 2071-2100 (minimum, 25^{ème} centile, 50^{ème} centile, 75^{ème} centile et maximum), et sont accompagnés des moyennes 2071-2100 pour le modèle corrigé Aladin-Climat (astérisques noirs) et le modèle corrigé WRF (losanges noirs).



Figure 3. Ecarts des températures hivernales (°C) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8.5, aux horizons 2021-2050 (Ouzeau *et al.*, 2014). Pour chaque ligne, de gauche à droite : $25^{\text{ème}}$ centile de l'ensemble, WRF, Aladin-Climat, $75^{\text{ème}}$ centile de l'ensemble.

En ce qui concerne la pluviométrie, des changements spécifiques à chaque région du globe sont déjà observables. Ainsi à la fin du XX^{ème} siècle, on note une augmentation des précipitations dans les régions Nord du globe (les latitudes hautes), une réduction des précipitations en Chine, en Australie et dans le Pacifique, et une augmentation de la variabilité des pluies dans les régions équatoriales (**Figure 1B**) (Dore, 2005; Irannezhad *et al.*, 2014; Zhang & Cong, 2014).

I.2. En France métropolitaine

Selon les données de Météo France, depuis la fin du XIX^{ème} siècle, le réchauffement observé a été en moyenne de l'ordre de 1°C, avec des variations suivant les régions, +0,7°C dans le Nord et +1,1°C dans le Sud. Ces cinquante dernières années, l'analyse des données climatiques a montré une élévation de la température de l'ordre de 0,2 à 0,3°C par décennie et une évolution plus contrastée des précipitations. Dans la dernière étude du GIEC sur le climat en France, le climat durant le XXI^{ème} siècle est décomposé suivant un horizon proche, de 2021 à 2050, et un horizon lointain, de 2071 à 2100 (Ouzeau *et al.*, 2014).

D'ici la moitié du XXI^{ème} siècle, quels que soient les scénarios et les modèles, on devrait assister à une hausse des températures moyennes, comprise entre 0,6 °C et 1,3 °C, toutes saisons confondues (**Figure 2, Figure 3 et Tableau 2**). Ce phénomène serait plus prononcé dans le Sud-Est durant l'été (hausse prévue comprise entre 1,5 °C et 2 °C). Cette hausse des températures serait accompagnée par l'augmentation du nombre de jours de vagues de chaleur en été : entre 0 et 5 jours supplémentaires, voire de 5 à 10 jours dans des régions du quart Sud-Est. Une diminution des jours anormalement froids en hiver (entre -1 et -4 jours) est également prévue.

TEMPERATURE		C25	WRF	Aladin-Climat	C75
HIVER					
	RCP 2.6	+0,4 °C	Indisponible	+0,6 °C	+1,3 °C
2021-2050	RCP 4.5	+0,3 °C	+1,3 °C	+0,8 °C	+1,4 °C
	RCP 8.5	+0,5 °C	+0,8 °C	+1 °C	+1,6 °C
	RCP 2.6	+0,4 °C	Indisponible	+0,9 °C	+1,4 °C
2071-2100	RCP 4.5	+0,8 °C	+2 °C	+2 °C	+2 °C
	RCP 8.5	+1,9 °C	+3,6 °C	+3,4 °C	+3,4 °C
ETE					
	RCP 2.6	+0,7 °C	Indisponible	+1,2 °C	+2 °C
2021-2050	RCP 4.5	+0,6 °C	+1 °C	+1,3 °C	+1,9 °C
	RCP 8.5	+0,9 °C	+0,6 °C	+1,2 °C	+2 °C
	RCP 2.6	+0,6 °C	Indisponible	+1,3 °C	+2 °C
2071-2100	RCP 4.5	+1,4 °C	+1,2 °C	+2,9 °C	+2,9 °C
	RCP 8.5	+3,2 °C	+2,6 °C	+5,3 °C	+5,1 °C

Tableau 2. Ecarts des températures par rapport à la moyenne de référence 1976-2005, pour chacun des modèles et scénarios, en moyenne aux horizons 2021-2050 et 2071-2100 (Ouzeau *et al.*, 2014).



Figure 4. Evolution des précipitations en moyenne sur la France (°C) en hiver (à gauche) et en été (à droite), relativement à la référence 1976-2005 (Ouzeau *et al.*, 2014).

Les lignes continues correspondent aux moyennes d'ensemble de chaque scénario RCP (RCP2.6 en bleu, RCP4.5 en vert et RCP8.5 en rouge). L'enveloppe colorée correspondant à l'intervalle 5 %-95 % de l'ensemble. La courbe noire représente la moyenne d'ensemble des simulations « historiques » de 1950 à 2005, et l'enveloppe colorée associée la dispersion de cet ensemble. Les lignes discontinues et pointillées correspondent aux évolutions respectives pour les simulations Aladin-Climat et WRF. Les diagrammes en boîte donnent les distributions moyennes sur la période 2071-2100 (minimum, 25^{ème} centile, 50^{ème} centile, 75^{ème} centile et maximum), et sont accompagnés des moyennes 2071-2100 pour le modèle corrigé Aladin-Climat (astérisques noirs) et le modèle corrigé WRF (losanges noirs).



Figure 5. Ecarts des précipitations estivales (mm/jour) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8,5, aux horizons 2021-2050 (en haut) et 2071-2100 (en bas) (Ouzeau *et al.*, 2014).

Pour chaque ligne, de gauche à droite : 25^{ème} centile de l'ensemble, WRF, Aladin-Climat, 75^{ème} centile de l'ensemble.

De plus, une légère hausse des précipitations moyennes (entre 0 et 0,42 mm/jour) sera observée, en été comme en hiver, avec une forte incertitude sur leur distribution géographique (**Figure 4, Figure 5 et Tableau 3**).

•					
PRECIPITATIONS		C25	WRF	Aladin-Climat	C75
HIVER					
2021-2050	RCP 2.6	-0,13	Indisponible	+0,21	+0,34
	RCP 4.5	-0,21	+0,07	+0,01	+0,32
	RCP 8.5	-0,16	+0,41	+0,20	+0,41
2071-2100	RCP 2.6	-0,19	Indisponible	+0,10	+0,39
	RCP 4.5	-0,8	+0,54	+0,11	+0,42
	RCP 8.5	-0,13	+0,85	+0,28	+0,54
ETE					
2021-2050	RCP 2.6	-0,27	Indisponible	~0	+0,11
	RCP 4.5	-0,40	+0,42	+0,36	~0
	RCP 8.5	-0,49	+0,08	+0,15	~0
2071-2100	RCP 2.6	-0,31	Indisponible	+0,05	+0,14
	RCP 4.5	-0,48	+0,15	-0,16	~0
	RCP 8.5	-0,70	+0,32	-0,38	-0,17

Tableau 3. Ecarts des précipitations par rapport à la référence moyenne 1976-2005 (en mm/jour), pour chacun des modèles et scénarios, en moyenne aux horizons 2021-2050 et 2071-2100 (Ouzeau *et al.*, 2014).

Pour les années 2071-2100, on assistera à une forte hausse des températures moyennes, quels que soient les scénarios : de 0.9°C à 3,6°C en hiver et de 1.3°C à 5,3°C en été. Cette hausse devrait être particulièrement importante vers le Sud-Est du pays et pourrait dépasser largement 5°C en été. Par ailleurs, le nombre de jours de canicule en été devrait dépasser les 20 jours. Le nombre de jours de grand froid devrait continuer à décroitre : entre 6 et 10 jours de moins que la référence dans le Nord-Est de la France. Cette diminution devrait être plus limitée dans le Sud. Les précipitations hivernales moyennes devraient augmenter de 0,1 à 0,85 mm/jour. En été, les prédictions des variations des précipitations sont plus incertaines, avec soit une diminution, soit une augmentation suivant le modèle utilisé.

I.3. Impacts du changement climatique

Les conséquences observées ou prévisibles du changement climatique sont multiples. Des perturbations météorologiques et écologiques, mais aussi des impacts biologiques, et économiques sur les activités humaines comme l'agriculture, sont observables (**Figure 6**). L'effet du réchauffement climatique est déjà largement visible. La fonte des grands glaciers de l'Ouest de l'Antarctique, qui contiennent assez d'eau pour faire monter les océans d'au moins un mètre, s'accélère sous l'effet du réchauffement climatique et paraît irréversible (**Figure 7**) (Baker & McGowan, 2014; Joughin *et al.*, 2014). Cette fonte des neiges contribue déjà de façon importante à la montée des océans, relâchant presque autant de glace



Figure 6. Impact des changements climatiques à échelle mondiale (IPCC, 2014).

Schéma global des impacts climatiques au cours des dernières décennies, basé sur les études parues depuis le précédent rapport (2007). Les encadrés présentent les impacts au niveau des différentes zones géographiques. Les symboles indiquent les différentes catégories d'impacts, les symboles en trait 'plein' indiquent un fort effet des changements climatiques alors que ceux en trait 'contour' indiquent un effet mineur. La contribution relative des changements climatiques est indiquée par des barres à coté du symbole, les barres grisées représentent le degré de confiance de ces contributions.



Figure 7. Topographie du lit du Glacier de Thwaites (Joughin et al., 2014).

L'observation de l'élévation sous-glaciaire est issue de données de radars aéroportés. La ligne noire indique le front du glacier actuel. Si on s'intéresse uniquement à cette zone (la boîte), les lignes bleues, rouges et grises indiquent la position du front prévue dans 250 ans pour les cas du fonte lente (m = 1), et du fonte rapide (m = 2,WM et m = 4).

annuellement dans l'océan que toute la banquise du Groenland. Walther *et al.* (2002) notent la variation de la phénologie et la perturbation de la dynamique de populations animales et végétales dans différents contextes écologiques.

Les populations végétales, du fait de leur migration lente par propagation, sont beaucoup plus affectées par les changements climatiques que les populations animales, notamment les plantes pérennes qui ont dû adapter leur cycle de vie aux conditions environnementales.

Chez les plantes pérennes, l'impact de températures élevées est différent selon qu'il aurait lieu en hiver ou en été. De fortes températures hivernales vont avoir un fort impact sur la phénologie de la floraison alors que de fortes températures estivales vont modifier la qualité des fruits. La phénologie de la floraison des arbres fruitiers apparait très affectée par l'élévation des températures. Cette vulnérabilité tient notamment à la longueur du cycle (du bourgeon au fruit), mais aussi à l'effet de la température sur différents stades phénologiques clés du développement tels que le débourrement (éclosion du bourgeon), la floraison, et la fructification. Ces étapes majoritairement printanières sont, particulièrement, sensibles aux changements climatiques, notamment la floraison (Wolfe *et al.*, 2005).

L'étude de différentes espèces fruitières a montré que les plantes pérennes répondaient de manière propre et différente aux variations climatiques selon leurs besoins en froid, nécessaires à la levée de dormance, et en chaud, nécessaires à la croissance du bourgeon (Domergue *et al.*, 2004). Les travaux de modélisation sur la durée de floraison du pommier (Legave *et al.*, 2008) montrent que le réchauffement climatique engendre deux effets opposés en France : d'une part, la durée moyenne nécessaire pour satisfaire les besoins en froid augmente, tandis que celle relative aux besoins en chaleur diminue.

Ces deux faits conjugués expliqueraient l'avancée de la date de floraison. En outre, le manque de froid des automnes et hivers doux provoquerait une floraison erratique suite à une levée de dormance incomplète (Legave, 2008). Les printemps plus chauds favoriseraient une floraison précoce, exposant les arbres à des risques de gel accrus et induisant une réduction de la production par l'augmentation des nécroses florales totales ou partielles et chutes de jeunes fruits (Marafon *et al.*, 2011; Luedeling, 2012). De plus, des températures excessives lors de l'initiation florale pourraient induire des anomalies observables l'année suivante avec l'apparition de fruits doubles pouvant atteindre 80% de la production chez le cerisier (**Figure 8**). Les températures élevées lors de la fructification peuvent également affecter la qualité du fruit. De façon assez générale, une augmentation des températures entraine une diminution de la coloration de l'épiderme des fruits (Gouws & Steyn, 2014; Niikawa *et al.*, 2014).



Figure 8. Fruit double résultant de températures élevées durant l'été de l'année précédente (Charlot, 2008).

Chez la vigne, une augmentation des températures entraine une diminution de l'acidité titrable et une augmentation de la concentration en sucre conduisant à la production de vin avec un degré d'alcool plus élevé (Barnuud *et al.*, 2014a; Barnuud *et al.*, 2014b). Si ces fortes chaleurs sont de plus associées à un manque d'eau lors de la phase de reproduction, le rendement est fortement affecté (Odo Camps & Concepcion Ramos, 2012). Ceci a été le cas depuis les années 1960 pour la vigne dans le nord-est de l'Espagne.

Face aux effets des changements climatiques qui devraient être majeurs dans le Sud et le Sudest, une première stratégie serait le choix de matériel végétal adapté aux futures conditions climatiques, avant d'envisager une stratégie de déplacement des zones de production ou plantation, solutions problématiques pour les produits AOP et autres produits de terroir, tels que les pruneaux d'Agen, les cerises noires d'Itxassou ou les vins de Bordeaux...

II. Le cerisier

II.1. Origine et domestication

Origine de Prunus avium L.

La région d'origine de l'espèce *Prunus avium* L., à laquelle appartient le cerisier doux, serait située dans une zone s'étendant entre la Mer Noire et la Mer Caspienne (De Candolle, 1883; Vavilov, 1951). A partir de cette région, *Prunus avium* L. se serait amplement dispersé jusqu'en Europe occidentale, les oiseaux étant les principaux agents de dissémination (Zohary & Hopf, 2000). En Europe, pendant l'épisode glaciaire du Quaternaire, les forêts se sont « réfugiées » dans différents régions du Sud (Espagne, Italie, Balkans) à partir desquelles elles se sont ensuite dispersées lors de la colonisation postglaciaire (Hewitt, 2000; Petit *et al.*, 2003). Les premières études phylogéographiques de populations de *P. avium* d'Europe occidentale n'ont pas permis d'identifier de route de colonisation spécifique pour cette espèce, toutefois les populations de l'Est de l'Europe (notamment celles Roumanie et Géorgie) sont apparues très différenciées des populations d'Europe centrale et de l'ouest ce qui suggère que la Géorgie ait pu être un refuge postglaciaire important (Tavaud, 2002).

De nos jours, *Prunus avium* est adapté à une vaste gamme de climats allant des îles grecques en Méditerranée aux montagnes de l'Oural en Sibérie. Il couvre une large zone qui s'étend de l'Asie de l'Ouest aux régions atlantiques d'Europe occidentale (Iezzoni *et al.*, 1990).


Figure 9. Classification de la famille des Rosaceae selon Potter et al. (2007).

Domestication du cerisier

Selon les données archéologiques, l'agriculture est apparue entre 10000 et 8000 ans avant JC, avec les premières cultures de céréales (Harlan, 1995). Mille ans après, on vit les premières domestications sur des céréales et légumineuses (Zohary & Hopf, 2000). Ce n'est que vers 4000 ans avant JC que les premiers fruitiers furent domestiqués dans l'est du bassin méditerranéen. Il faudra attendre 1000 avant J.C. pour observer les premières domestications de cerisier. Les cerisiers seront alors sélectionnés pour leurs fruits, gros et doux, et un port plus trapu, favorable pour les récoltes. Certains auteurs situent le centre de domestication du cerisier dans la région du Caucase près de la Mer Noire, d'autres auteurs le placent en Grèce (Hedrick *et al.*, 1915). La domestication du cerisier serait multi-sites, des introgressions à partir des formes sauvages (merisiers) après la domestication ne peuvent pas être exclues. Ce qui complexifie les schémas de diversité attendus sous les seuls effets de domestication (Tavaud, 2002).

II.2. Taxonomie

II.2.1. Famille des Rosaceae

La famille des *Rosaceae* réunit plus de 3000 espèces réparties dans le monde entier, bien que plus répandues dans les régions froides et tempérées du Nord. Elle compte de nombreuses espèces d'intérêt économique, aussi bien des arbres et arbustes fruitiers tels que le pommier (*Malus domestica* Borkh.), poirier (*Pyrus communis* L.), ou framboisier (*Rubus idaeus* L.), que des espèces herbacées vivaces fruitières, le fraisier (*Fragaria sp.*), des espèces ornementales telles que le rosier (*Rosa sp.*), le photinia (*Photinia floribunda* Lindl.), le cognassier de japon (*Chaenomeles japonica* Lindl. ex Spach), ou la potentille (*Potentilla sp.*) ou encore des espèces forestières, le merisier (*Prunus avium* L.). Une grande partie des fruits cultivés dans les régions tempérées provient d'espèces appartenant à cette famille.

Cette famille présente la caractéristique d'avoir des fleurs à symétrie rayonnée, presque toujours parfaites et pentamères : les pièces florales sont toujours organisées par multiple de 5. Les espèces de cette famille présentent des feuilles généralement alternes, simples à divisées ou composées.

Selon Potter *et al.* (2007), cette famille est divisée en 3 sous-familles (*Rosoideae*, *Dryadoideae*, et *Spiraeoideae*) (**Figure 9**). Ces sous-familles comprennent plusieurs genres dont les plus représentés sont les suivants : *Fragaria, Rosa, Potentilla, Rubus* appartenant aux *Rosoideae*, le genre *Dryas* appartenant aux *Dryadoideae*, et les genres *Malus, Pyrus* et *Prunus* appartenant aux *Spiraeoideae* (**Figure 10**). Le type de fruits est spécifique



Figure 10. Famille des *Rosaceae*, divisée en trois sous- familles (*Rosoidae*, *Dryadoideae*, *Spiraeoidae*) selon la classification selon Potter *et al.* (2007).



Figure 11. Classification du genre Prunus selon Rehder (1949).

des genres : akène pour le genre *Fragaria*, piridion pour les *Malus* et *Pyrus* et drupe pour les *Prunus*. Enfin, le nombre de chromosomes est variable: x = 7 pour la sous-famille Rosoideae, 9 pour la sous-famille Dryadoideae, et pour la sous-famille des Spiraeoideae, il est variable suivant le genre (8 pour le genre *Prunus*, 9 pour les genres *Kerria* et *Spiraea*, 17 pour les genres *Malus* et *Pyrus* (**Figure 10**).

II.2.2. Genre Prunus

Le genre *Prunus* regroupe plus de 200 espèces d'arbres ou d'arbustes pérennes, dont la plupart sont des espèces fruitières telles que l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), l'amandier [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb], le pêcher (*Prunus persica* L.), le prunier (*Prunus domestica* L.), le cerisier doux (*Prunus avium* L.), le cerisier acide (*Prunus cerasus* L.) ou des espèces ornementales telles que le cerisier du japon (*Prunus serrulata* Lindl.), le cerisier de Virginie (*Prunus virginiana* L.) ou le laurier-cerise (*Prunus laurocerasus* L.). Ce genre appartient à la tribu *Amygdaleae* de la sous-famille *Spireoideae* (Potter *et al.*, 2007).

Le genre *Prunus* regroupe cinq sous-genres : *Cerasus, Amygdalus, Prunophora, Padus* et *Laurocerasus* (**Figure 11**) (Rehder, 1949). Le nombre chromosomique de base des espèces de ce genre est de x=8. Le niveau de ploïdie est variable : diploïde (2n=2x=16) pour le pêcher, l'amandier, l'abricotier, le cerisier doux, tétraploïde (2n=4x=32) pour le cerisier acide et le cerisier intermédiaire (*Prunus x gondouinii*), hexaploide (2n=6x=46) pour le prunier domestique.

II.2.3. Sous-genre Cerasus

Le sous-genre Cerasus regroupe les Eucerasus ou cerisier vrais (*P. avium* L. et *P. cerasus* L.), les Pseudocerasus (*P. serrulata*, *P. incisa*), les Microcerasus (*P. japonica*, *P. besseyi*) et les Mahaleb (*P. mahaleb*) (**Figure 11**).

Les espèces fruitières appartenant au sous-genre Cerasus sont exploitées pour leurs fruits (*P. avium L., P. cerasus L., Prunus x gondouinii* Rehd) ou utilisées comme porte greffe (*P. mahaleb*).

Prunus avium L. (ou *Cerasus avium* (L.) Moench) regroupe les merisiers exploités pour le bois et les cerisiers cultivés pour leurs fruits sucrés, les oiseaux ont joué un grand rôle dans leur dissémination. Sa distribution géographique est vaste englobant une partie de l'Europe, le Caucase et la Turquie, l'Iran, l'Afghanistan. On les trouve presque partout en France jusqu'à 1700 mètres d'altitude. L'arbre vigoureux, le plus fréquemment à port érigé, peut atteindre 25 à 30m de haut en forêt, et 15m dans les vergers. La taille du fruit est très variable. Petits à



Figure 12. Différents organes du cerisier doux (*Prunus avium*) et du cerisier acide (*Prunus cerasus*). (http://www.vdsciences.com/medias/images/sans-461.titre)



Figure 13. Caractéristiques des différents types de cerises.

l'état sauvage, ils peuvent atteindre 15g pour certaines variétés cultivées. La couleur va du rouge-noir au blanc. Leur goût est le plus souvent sucré mais parfois amer. Dans le compartiment cultivé de *Prunus avium* on distingue les cerises à chair ferme (bigarreaux) de celles à chair molle (guignes) (**Figure 12, Figure 13 et Figure 15**).

Prunus cerasus L. (ou *Cerasus acida* Gaertn.) est un arbre de petite taille ne dépassant pas 10m, appelé aussi griottier, produisant des cerises acides utilisées pour l'industrie après transformation. Cette espèce serait issue du croisement entre *Prunus fructicosa et Prunus avium* (Figure 14 et Figure 15) (Tavaud, 2002). Cette espèce est originaire de la région de la mer Caspienne, de l'Asie Mineure et d'Europe. On distingue les cerises plus ou moins tendres à jus coloré [griottes, morelles (griotte du Nord...)], et les cerises molles à jus clair [amarelles (cerise de Montmorency...)] (Figure 12 et Figure 13).

Prunus x gondouinii Rehd. (ou *Prunus acida* Dum, *Cerasus regalis, Prunus avium* ssp. *regalis*) = cerisier intermédiaire. Cette espèce est issue du croisement de gamètes non réduits de *P. avium* et de gamètes de *P. cerasus* (Figure 14 et Figure 15). Ce sont des arbustes de petite taille, 6m, compacts avec une floraison abondante. Moins cultivés que le cerisier doux et acide, on trouve néanmoins de nombreuses variétés issues de sélections telles que la cerise Impératrice Eugénie, le Gros Guin Noir de Gironde, le Guin des Charentes et la Maynard. Ces cerises dites intermédiaires, anglaises ou duke sont petites, sphériques, molles et acidulées. Les variétés sont classées en deux catégories en fonction du fruit : à jus coloré [cerises anglaises (duke cherries)], et à jus clair (cerises royales) (Figure 13).



Figure 14. Relations entre les espèces de la section Eucerasus (Tavaud, 2002). * = existence de gamètes non-réduits impliqués dans les croisements.

Bractées internes



Prunus avium L. Prunus × gondouinii Rehd.



Prunus cerasus L.

Prunus cerasus L.

Fleurs



 $\label{eq:prunus avium L. Prunus \times gondouinii \quad Prunus \ cerasus \ L.$ Rehd.

Feuilles





Rehd.





Prunus × gondouinii Rehd. Prunus avium L.

Prunus cerasus L.

Fruits



Prunus avium L. Prunus × gondouinii Rehd.

Figure 15. Différences morphologiques entre le cerisier doux (Prunus avium), le cerisier intermédiaire (Prunus x gondouinii) et du cerisier acide (Prunus cerasus) (Perez et al., 2010).

D'autres espèces de cerisiers qui n'appartiennent pas à la section Eucerasus sont majoritairement cultivées pour leur valeur ornementale ou comme porte-greffe des cerisiers doux et acides, notamment :

Prunus mahaleb L. (ou *Cerasus mahaleb* (L.) Mill) appelé également cerisier mahaleb, cerisier de Sainte Lucie, cerisier odorant, faux merisier, quénot, canot, canonier, amarel ou encore prunier odorant (**Figure 16**). C'est un arbuste odorant de moins de 10m, autrefois très apprécié des ébénistes et tourneurs. Le bois, l'écorce et les feuilles dégagent une agréable et durable odeur de coumarine (odeur de foin fraichement coupé). Il est assez commun dans toute l'Europe occidentale, autour de la Méditerranée au Maroc et au Moyen-Orient et en Asie centrale et se trouve surtout sur des terrains calcaires, ensoleillés dans les friches, haies, lisières et bois clairs ou les garrigues. Il ne craint pas la sécheresse et résiste aussi bien à la chaleur qu'au froid. En arboriculture, on l'utilise comme porte-greffe pour le cerisier.



Figure 16. Différents organes de Prunus mahaleb L. (Borzan, 2001)



Figure 17. Répartition de la production moyenne de cerises au niveau mondial (*D'après* Monfreda *et al.* (2008) *actualisé par l'institut sur l'environnement, Unniversité du minnesota, USA*). La majorité de la production mondiale a lieu en Europe sur le pourtour méditerranéen.



Figure 18. Répartition de la production moyenne de cerises au niveau européen (FAOSTAT, 2014).

II.3. Le cerisier : une plante d'intérêt agronomique

II.3.1. La production de la cerise

Le cerisier possède un important passé culturel. Consommé depuis plus de 7000 ans, il est de nos jours cultivé dans de nombreux pays de zones tempérées avec plus de 370 variétés modernes différentes. Ses vertus antioxydantes, sa forte teneur en sucre, fibre et vitamine C, et son agréable goût acidulé font de la cerise le deuxième fruit rouge le plus consommé au monde après la fraise. Avec une production mondiale d'environ 2 millions de tonnes par an, les bassins privilégiés sont l'Europe avec plus de 50% de la production, l'Asie avec 30% et l'Amérique du nord avec 15% (**Figure 17 et Figure 18**). Les plus gros producteurs mondiaux sont la Turquie (~21% de la production mondiale) et les États-Unis (~17% de la production mondiale). Les premiers exportateurs mondiaux sont les États-Unis, le Chili, la Turquie et l'Espagne (France, 16^{ème} exportateur) alors que les plus grands importateurs mondiaux sont la Russie, l'Allemagne, le Canada et la Chine (France, 11^{ème} importateur).

En France, la production atteint environ 50 000 T depuis plus de 10 ans (contre 100 000 T en 1985) (Figure 19) avec toutefois de grandes variations annuelles dues aux accidents climatiques (2 800 kg/ha produites en 1998 au lieu 5 000 kg/ha produites en moyenne en France). La France subit actuellement une concurrence très sérieuse de la part de l'Espagne pour les variétés précoces. Ce pays produit aujourd'hui deux fois plus de cerises que la France (98400 T contre 30440 T pour la France en 2012, FAOSTAT (2014)) alors qu'il y a un peu plus d'une vingtaine d'années la situation était inversée. En France, les vergers de cerisiers (cerisaies) sont de petite taille, 75% des cerisaies présentent une surface inférieure à 2 hectares mais le nombre de producteurs reste très élevé (plus de 4000 en 2010 ; Agreste Primeur (2012)). La plupart d'entre eux produisent également d'autres fruits tels que des pommes et des abricots, la cerise représentant une source de financement tôt en saison. Or, dans un contexte économique compliqué pour la profession, avec les difficultés rencontrées actuellement par les producteurs de pommes et de prunes, une plus grande diversification des espèces pourrait être une solution pour les arboriculteurs. De plus, cette culture est décalée par rapport aux autres et n'entre donc pas en concurrence avec les autres productions de l'exploitation au niveau de l'organisation du travail ou au niveau de la commercialisation des fruits. La principale zone de production en France est actuellement le Sud Est alors qu'au début du siècle, le cerisier était très présent dans plusieurs départements de la région Aquitaine, notamment dans l'Entre Deux Mers en Gironde. Toutefois cette production reste capitale pour l'économie de certains territoires aquitains notamment dans le Pays Basque à Itxassou où une dynamique de relance des variétés locales s'est développée ces



Figure 19. Répartition géographique de la production française de cerises douces (AOP Cerises, 2014). Selon les derniers chiffres de l'AOP Cerises de France, la majorité de la production se fait en Provence (35%) et Rhône-Alpes (33%). Les autres bassins de production sont le Languedoc-Roussillon (13%), Midi-Pyrénées (8%) et le Val de Loire (5%).

dernières années. Elle s'est traduite par la création d'un GIE (Groupement d'Intérêt Economique) « Cerise d'Itxassou » (actif de 1995 à 2009) et de l'association XAPATA (depuis 2006), qui réunit actuellement une vingtaine de producteurs des cantons d'Espelette, d'Hasparren et de St Etienne-de-Baïgorry et qui a permis une augmentation notable des arbres en production (3 fois plus qu'en 1983).

II.3.2. Une plante exigeante

La température joue un rôle primordial pour le développement du cerisier : au niveau du processus de floraison, la pollinisation et la formation du fruit. Le cerisier est très sensible aux températures chaudes. Bien qu'il ait des besoins en froid importants (entre 700 et 1300 heures de froid), le cerisier doux est moins résistant que le cerisier acide aux froids hivernaux. Des dégâts peuvent apparaitre sur racine en dessous de -10° C de façon plus ou moins importante en fonction du porte-greffe. La sensibilité au gel printanier dépend des variétés mais on situe un seuil de tolérance à : $-1,1^{\circ}$ C pour les jeunes fruits, $-1,7^{\circ}$ C pour les fleurs épanouies, $-2,2^{\circ}$ C pour les boutons blancs et $-3,9^{\circ}$ C pour les boutons verts. Le cerisier préférera un sol assez poreux avec une bonne circulation de l'air et de l'eau. La densité de plantation est variable de 3×4 m (833 arbres par hectare) à 6×5 m (333 arbres par hectare) selon le porte-greffe et la forme de conduite choisis. Un apport de pollinisateurs peut être effectué lors de la floraison (4 à 5 ruchers par hectare).

D'autres éléments ont une grande influence sur le bon développement du cerisier comme la lumière, l'eau et le vent :

- l'eau: le cerisier exige des quantités importantes en eau pour une bonne croissance ; entre 3000 et 5000 m³ par an et par hectare. En revanche, il craint l'excès en eau, notamment lors des hivers et printemps pluvieux, qui peuvent provoquer une asphyxie racinaire. La pluie est problématique pendant la floraison car elle gêne l'activité des abeilles et entraine l'apparition du monilia, et lors de la maturité provoquant l'éclatement de la peau des fruits.

- la lumière : permet le développement des rameaux, l'induction florale, la longévité des bouquets de mai, et le bon déroulement de la fructification notamment pour la maturation des fruits. Toutefois, en trop grande quantité, elle provoque des brûlures se traduisant par des nécroses.

- le vent: néfaste, il provoque une déformation des charpentes, dessèchement et chute des bourgeons, ainsi que des fruits.

En plus de ces contraintes, la culture du cerisier doit faire face aux maladies et aux ravageurs. Peu de maladies graves transmises par des virus existent aujourd'hui chez le cerisier. En revanche, des maladies bactériennes telles que le chancre bactérien (causé par Pseudomonas syringae) peuvent provoquer la mort des arbres dans des parcelles entières dans certaines conditions climatiques. Au niveau fongique, le principal problème est le monilia, sur fleur et sur fruit, provoqué par Monilinia laxa et Monilinia fructigena. Quant aux insectes ravageurs, le puceron noir est un ennemi redoutable, notamment dans les jeunes plantations. Mais le principal problème de type phytosanitaire chez le cerisier est sans doute celui des mouches. Jusqu'à très récemment, seule l'espèce *Rhagoletis cerasi* représentait un problème dans toutes les zones de production. Cependant, une nouvelle mouche, Drosophila suzukii, de la famille des drosophiles a fait son apparition en Europe et aux Etats-Unis à la fin des années 2000. Introduite en Espagne en 2008, elle s'attaque à tous les fruits à chair tendre (cerises, fraises, framboises, prunes, raisins) et à de nombreux fruits sauvages. Les populations se sont développées très fortement en 2014 à cause de l'hiver doux et de l'été humide. Les attaques sur cerises ont provoqué en 2014 des pertes de récoltes parfois massives. Pour lutter contre cette drosophile on peut protéger les vergers par des filets à maille fine, ou affaiblir les attaques de drosophile en récoltant tôt, fréquemment et complètement. Dans les vergers de cerisiers avec plusieurs variétés de précocités différentes, les plus précoces doivent être récoltées totalement pour qu'aucune cerise trop mûre ne serve de site de reproduction.

La cueillette de la cerise est manuelle et la cerise ne se conserve pas longtemps après la récolte. Le coût de la main d'œuvre nécessaire est responsable, en grande partie, du prix de vente qui reste relativement élevé, même pendant la pleine saison. Le coût de la main d'œuvre, moins élevé dans d'autres pays européens tels que l'Espagne, contribue à la forte concurrence de ces pays sur le marché français.

II.3.3. L'amélioration variétale du cerisier doux

Parmi les *Prunus*, la création variétale du cerisier est le deuxième programme le plus important, après le pêcher, avec près de 230 nouvelles variétés enregistrées entre 1991 et 2004 (Lugli & Sansavini, 2008). Les principaux programmes d'amélioration du cerisier sont conduits, majoritairement, en Europe, puis en Amérique du Nord et en Asie.

Pour le cerisier doux, la production étant presque entièrement destinée à la consommation en frais, l'objectif principal des sélectionneurs est de produire des cerises à gros fruits fermes, résistants au transport et à l'éclatement, avec un noyau de faible dimension par rapport à la taille du fruit. Ces dernières années, les sélectionneurs ont élargi ces objectifs pour s'intéresser à l'élargissement de la gamme de maturité (Kappel & MacDonald, 2000), aux problèmes d'auto-incompatibilité (pour éviter l'introduction dans les vergers des arbres non-

profitables), au port et à la vigueur des arbres (pour faciliter la gestion des vergers), à la tolérance au chancre bactérien et au champignon monilia (Vittrup Christensen, 1996). En outre, compte tenu du réchauffement climatique déjà visible, les critères liés à l'adaptation au changement climatique font maintenant partie des critères à intégrer dans les programmes de sélection. Cette sélection de variétés est menée en parallèle à la sélection de porte-greffes et à l'optimisation des modes de culture (Moreno *et al.*, 2001).

Le programme d'innovation variétale cerisier de l'INRA est mené en partenariat avec CEP INNOVATION regroupant une trentaine de pépiniéristes associés. Ensemble, ils représentent environ 90% de la production française de plants de fruitiers destinés aux arboriculteurs dans les espèces à pépins et à noyau. Les objectifs de ce programme visent des caractères impactant à la fois sur la productivité et la qualité de la production, telles que l'adaptation des variétés au climat (au travers des besoins en froid, besoins en chaud, et date de floraison), l'élargissement du calendrier de récolte de la gamme variétale, l'augmentation du poids du fruit, l'amélioration de la fermeté et de la saveur et la recherche de la tolérance à l'éclatement.

Depuis 1960, l'amélioration variétale est principalement réalisée par croisements contrôlés (Bargioni *et al.*, 1998). L'obtention d'une nouvelle variété est alors un processus long et fastidieux (environ 24 ans, **Annexe 1**), composé d'une phase de création variétale, de sélection variétale, et, enfin, d'une phase de sortie variétale. La culture *in vitro* d'embryons est utilisée pour améliorer le pourcentage de germination, en particulier pour les génotypes précoces. Pour permettre une sélection plus rapide des plants d'intérêt, sans passer par la sélection phénotypique des hybrides, le criblage moléculaire (Sélection assistée par marqueurs, SAM) est actuellement réalisé pour la taille et la couleur du fruit et pour les allèles d'auto-incompatibilité à l'Université de Washington (Edge-Garza *et al.*, 2012) et est en cours de développement pour le poids et la fermeté du fruit à l'INRA de Bordeaux. A plus long terme, le développement de la SAM pour la sélection de variétés à faibles besoins froid devrait être initié après avoir approfondi les connaissances sur le déterminisme génétique de ce caractère.

II.4. Caractéristiques biologiques du cerisier

On distinguera deux grandes périodes au cours de la vie du cerisier, une période dite juvénile et l'autre dite adulte. Le cerisier débute sa croissance par une période juvénile (de 3 à 7 ans) pendant laquelle le développement végétatif est favorisé. Le passage à l'état adulte s'observera par l'apparition de bourgeons floraux sur les jeunes rameaux. On aura alors un équilibre entre croissance de l'arbre et production de fruits.



Figure 20. Bouquet de mai.



Figure 21. Rameaux de cerisier.

Un verticille est formé entre le bois de deux ans (Année N-2) et celui d'un an (Année N-1). Les bourgeons en rouge sont des bourgeons floraux (F), ceux en vert sont des bourgeons végétatifs (V). Les grandes flèches vertes représentent la future pousse de rameaux longs, les petites flèches vertes représentent celle de rameaux courts.

II.4.1. Développement végétatif

Au cours de la croissance des rameaux, des bourgeons se forment latéralement à l'aisselle des feuilles. Ces bourgeons entrent généralement en activité l'année suivante, après une période de repos. On distinguera alors deux types de bourgeons, les bourgeons végétatifs qui contribuent au développement végétatif de l'arbre, et les bourgeons floraux dévolus à la floraison. A la fin de la floraison, la croissance des bourgeons végétatifs débute. Il s'agit généralement d'une croissance rythmique, monopodiale et acrotone. En effet, c'est le bourgeon terminal qui assurera la reprise de la croissance et le prolongement de la branche. Généralement, on observe une seule phase de croissance au cours de l'année. Cette croissance annuelle s'étale de la floraison jusqu'en septembre pour un arbre juvénile, et peut alors dépasser un mètre de longueur lors des premières années. Chez l'arbre adulte, elle a tendance à s'arrêter vers la mi-juin.

Chez le cerisier, deux types de rameaux sont nettement différenciés (Figure 20 et Figure 21):

- Les rameaux courts ou bouquet de mai, constitués d'un petit nombre d'entrenœuds très courts, dont les ébauches sont contenues dans le bourgeon terminal latéral. Les bouquets de mai sont constitués d'un empilement d'unités de croissance très courtes (quelques millimètres par an), la dernière portant les bourgeons (un bourgeon végétatif central entouré de 1 à 10 bourgeons floraux). Ils apparaissent d'abord dans la partie supérieure du bois de 2 ans. Puis avec les années, ils se répartissent plus ou moins rapidement sur toute la longueur, jusqu'à la zone dénudée. Au cours de leur vieillissement, on remarque une baisse de productivité, avec des bouquets moins denses contenant moins de bourgeons floraux, eux-mêmes pouvant contenir moins de fleurs.
- Les rameaux longs (branche de l'arbre) qui, après allongement des entre-nœuds préformés dans le bourgeon, continuent leur croissance et développement des entre-nœuds néoformés. Alors que le bourgeon terminal apical assure le prolongement de la branche, il peut arriver que des bourgeons subapicaux donnent en même temps des rameaux longs latéraux (1 à 4), de longueur comparable, formant un verticille¹ (« patte d'oie »).

II.4.2. De la floraison à la fructification

Les bourgeons floraux contiennent un nombre variable de fleurs, généralement compris entre 2 et 4, plus rarement 1 ou 5. On distingue deux types d'organisation (**Figure 21**):

¹ Ensemble de rameaux longs implantés sur un axe au même niveau.

Groupe d'incom- patibilité	S-Genotype	Variétés
I	S_1S_2	Black Tartarian, Early Rivers, Sparkle, Starking Hardy Giant, Summit
II	S_1S_3	Cristalina, Gil Peck, Lamida, Regina , Samba, Sumele, Van, Venus
III	S_3S_4	Bing, Emperor Francis, Kristin, Lambert, Napoleon, Sommerset, Star, Ulster,
IV	S_2S_3	Merton Premier, Sue, Vega, Velvet, Victor, Viva, Vogue,
V	S_4S_5	Late Black Bigarreau
VI	S_3S_6	Elton Heart, Governor Wood, Hartland, Satonishiki, Ambrunesa, Duroni 3
VII	S_3S_5	Hedelfingen
VIII	$S_{2}S_{5}$	Vista
IX	S_1S_4	Black Republican, Chinook, Merton Late, Rainier, Sylvia, Garnet, Viscount*
Х	$S_6 S_9$	Early Lyons, Black Tartarian, Ramon Oliva*
XII	$S_6 S_{13}$	Noble*
XIII	S_2S_4	Corum, Deacon, Merchant*, Peggy Rivers, Royalton, Sam, Schmidt, Vic
XIV	S_1S_5	Valera
XV	S_5S_6	Colney
XVI	S_3S_9	Burlat, Moreau, Chelan, Tieton
XVII	S_4S_6	Elton Heart, Merton Glory, Larian
XVIII	S_1S_9	Brooks, Marvin, Earlise
XIX	$S_{3}S_{13}$	Reverchon
XX	$S_1 S_6$	Fernier
XXI	S_4S_9	Inge
XXII	$S_{3}S_{12}$	Princess, Schneiders
XXV	S_2S_6	Arcina
XXVI	$S_5 S_{13}$	Ferbolus, Schwarze der Lobenroth
XXVII	$S_4 S_{12}$	Hungarian clone H209
XXVIII	S_1S_7	Benjaminer, Ortenauer
XXIX	S_4S_7	Ritterkirsche, Stolzer
XXX	$S_{6}S_{7}$	Brennkirsche Doll, Schwarze Schüttler
XXXI	$S_4 S_{14}$	Feuerkirsche, Rotstiller
XXXII	$S_{1}S_{12}$	Johanna
XXXIV	$S_{3}S_{14}$	Durone di Verona
XXXV	$S_5 S_{14}$	Herzkirschen, Melitopolskaja rannaja
XXXVI	$S_7 S_{19}$	Rote Kirsche
SC/O	S_3S_4'	Newstar, Sonata, Stella, Sunburst, Staccato, Sweetheart
SC/O	S_1S_4'	Celeste, <u>Lapins</u> , Santina, Skeena
SC	S_3S_6	Cristobalina

Tableau 4. Groupes d'incompatibilité et génotypes de l'allèle S pour les variétés de cerises douces les plus cultivées (Dirlewanger *et al.*, 2007).

Les parents des deux descendances étudiées sont soulignés. La variété 'Cristobalina' a été rajouté selon Wünsch et al. (2010). SC: variétés auto-compatibles ; O: Donneur universel ; *: Variétés signalés avec un autre génotype S.



Figure 22. Système d'auto-incompatibilité gamétophytique.

- Les bourgeons isolés à la base du bois de 1 an. Ils ont été préformés dans le bourgeon végétatif terminal de l'année précédente. Peu nombreux au stade juvénile, on en compte 1 à 8 par rameaux de 1 an (selon les variétés) chez l'arbre adulte. Ils fleurissent en premier, généralement 24 à 48h avant les bouquets de mai et assurent les premières fructifications du jeune arbre. Après fructification ou non, ils laissent l'année suivante une zone dénudée représentant 18 à 26% de la longueur du rameau.
- Les bouquets de mai comprenant 1 à 10 bourgeons floraux

La répartition et l'abondance de la floraison peut dépendre de nombreux facteurs tels que les variétés choisies (greffon et porte-greffe), l'âge et la vigueur de l'arbre, l'inclinaison du rameau, l'importance du feuillage.

Le cerisier doux est une espèce allogame à pollinisation entomophile. La pollinisation du cerisier est réalisée principalement par les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) (60 à 95%), mais également les bourdons (*Bombus* sp), qui eux travaillent à des températures plus basses que les abeilles. La pollinisation par le vent est négligeable car le pollen est lourd et collant. La distance de pollinisation est variable selon la densité de fleurs dans le verger et peut atteindre une centaine de mètres (Lichou *et al.*, 1990).

Les cerisiers sont généralement auto-incompatibles. En effet, comme beaucoup de *Prunus*, le cerisier possède un système d'auto-incompatibilité gamétophytique dû au gène *S* localisé sur le groupe de liaison 6 des *Prunus* (**Tableau 4**) (Dirlewanger *et al.*, 2004b). Ce gène possède plusieurs versions alléliques (S1 à Sn) (De Nettancourt, 2001; De Cuyper *et al.*, 2005) et la fécondation ne peut avoir lieu qu'entre des gamètes présentant deux allèles différents à l'exception de l'allèle S4' (allèle d'auto-compatibilité). Ainsi trois cas de figures se présentent (**Figure 22**) :

- L'incompatibilité totale : pollinisation d'une variété, ou de deux variétés possédant la même paire d'allèles sur le gène S.
- L'incompatibilité partielle : pollinisation entre deux variétés possédant un seul des deux allèles en commun.
- La compatibilité totale : pollinisation entre deux variétés possédant des paires d'allèles différents.

La fécondation a lieu suite à l'arrivée du tube pollinique au niveau du sac embryonnaire. Après la fécondation, l'évolution du fruit est terminée au bout de deux mois. La croissance du fruit se déroule en trois phases : accroissement rapide du volume du fruit par multiplication



Figure 23. Cycle phénologique du cerisier.





(A) En début de dormance, l'arbre est au repos, les bourgeons d'hiver sont bruns, aigus et fermés. Puis (B) les bourgeons gonflés s'arrondissent et prennent à leur sommet une coloration vert clair. (C) Les écailles du sommet s'écartent et les boutons visibles sont encore rassemblés. (D) Les boutons se séparent, leur base est enveloppée par les écailles du bourgeon, la pointe blanche de la corolle est visible. (E) Les premiers boutons s'ouvrent partiellement et on voit les étamines. (F) C'est la pleine floraison, toutes les fleurs sont ouvertes.
(G) On observe la chute des pétales et l'enroulement des étamines. (H) Tous les pétales sont tombés, la base du calice commence à grossir, c'est la Nouaison. (I) Le calice tombe. (J) Le jeune fruit grossit rapidement et prend bientôt sa forme normale.

cellulaire (20 à 25 jours), durcissement du noyau (10 à 20 jours), et reprise du grossissement (10 à 20 jours avant la maturité).

II.4.3. Cycle phénologique de la floraison

Le cerisier, comme toutes les espèces pérennes, doit adapter son cycle de vie aux contraintes environnementales sur plusieurs années. Ceci implique qu'il doit alterner des phases de repos pour se protéger des périodes à risques et des phases de développement durant les périodes favorables (Figure 23). Chez le cerisier doux, l'ensemble des étapes aboutissant à la floraison est sous la dépendance de facteurs complexes internes et externes, principalement la température (Alburquerque et al., 2008). Chaque bourgeon floral suivra un cycle complet allant de l'induction florale à la fructification avec les différents stades phénologiques décrits par Baggiolini (1952) (Figure 24). Après la floraison, le développement des bourgeons végétatifs terminaux permet la formation d'un nouveau stock de bourgeons. Très tôt (après maturation des fruits), l'induction florale va permettre à certains bourgeons végétatifs néoformés d'acquérir l'aptitude à se transformer en bourgeons floraux. A partir de juin, des facteurs internes vont provoquer la différenciation florale de ces bourgeons et l'apparition d'ébauches de pièces florales. En été, les bourgeons vont stopper leur évolution pour s'apprêter à entrer en dormance. En automne, l'entrée en dormance des bourgeons est provoquée par la diminution des températures. Au cours de l'automne et de l'hiver, les bourgeons accumulent des unités de froid jusqu'à satisfaction des besoins spécifiques en froid requis pour permettre la levée de dormance. A la fin de l'hiver et au printemps, le bourgeon va gonfler et reprendre son développement. En effet, les températures douces vont permettent de satisfaire des besoins spécifiques en chaleur nécessaire à l'éclosion des bourgeons conduisant à la floraison, fructification et maturation des fruits. Pour l'ensemble de la gamme variétale, la floraison s'échelonne des derniers jours de mars à la fin avril en France. Il y aura alors formation et développement des fruits jusqu'à sa maturation en mai-juin. La maturité de la cerise est déterminée en fonction de la couleur du fruit, de son goût (teneur en sucre), et de sa fermeté. Parallèlement à ces évènements, de nouveaux bourgeons entament un nouveau cycle.

Le succès de ce cycle reproductif dépend essentiellement de sa synchronisation avec l'environnement favorable (Grennan, 2006). Si une plante fleurit trop tôt, les bourgeons peuvent subir des dommages à cause du gel, et les insectes reproducteurs peuvent être absents lors de la mise en fleur. Enfin, une maturité trop tardive pose problème en raison des fortes chaleurs et de risques accrus de pathogènes sur les fruits. Il est donc important de prendre en considération l'influence du changement climatique sur les stades phénologiques de la plante.



Figure 25. Cycle phénologique du cerisier perturbé par l'élévation des températures. Les flèches représentent le décalage subi par certaines étapes phénologiques.

Induction	Initiation	Dormance	Croissance	Floraison
florale	florale	florale	florale	(1 ^{ères} fleurs)
printemps	été -	automne -	hiver -	hiver -
année n-1	n-1	n-1 à n		
	SA			
Contrôle	Croissance	Besoins	Besoins en	T° élevées
hormonal /	ralentie	en T°	T° 'chaudes'	favorables/
croissance	T° élevées	'froides'	T° optimales	pollinisation
Aucun	(>25°C)	T° élevées	croissance =	néf. /ovules
effet	peu	(>15°C)	T° modérées	T° < 0°C
direct 1	néfastes	néfastes		néfastes

Figure 26. Etapes phénologiques dans l'élaboration de la floraison du cerisier perturbées par l'élévation des températures (Legave, 2008).



Figure 27. Observation des impacts dus à l'élévation des températures au niveau des fleurs de cerisier (Charlot, 2008).

II.4.4. Impact du réchauffement climatique sur la phénologie de la floraison

L'effet de l'élévation des températures en hiver et au printemps est déjà visible chez le cerisier, notamment dans les régions du sud. Ainsi, Oukabli (2004) décrit une diminution de la charge en bouquets de mai ainsi qu'un allongement de la période végétative, mais aussi une dormance perturbée. Le manque de froid pourrait conduire à une inhibition de la levée de dormance qui entrainerait un étalement du débourrement dans le temps et des perturbations au niveau de la floraison (**Figure 25**). L'analyse des structures anatomiques internes des bourgeons floraux montre des anomalies des organes reproducteurs (**Figure 26**). Les ovaires sont atrophiés et isolés. On note des anomalies pistilaires avec l'apparition de pistils réduits voire absents. Le tissu nucellaire est séparé des téguments, signe de dégénérescence ovulaire. Les anthères présentent une mauvaise maturation et des signes d'avortement. Les sacs polliniques renferment un faible nombre de grains de pollen, souvent immatures. Bien que la floraison du cerisier soit généralement abondante, ces malformations et avortements ovulaires et polliniques réduisent les chances de fructification (**Figure 27**). Des constatations similaires ont été faites en France (Charlot, 2008), en Australie (Thomas *et al.*, 2012; Measham *et al.*, 2014), et au Japon (Primack *et al.*, 2009).

II.5. Ressources disponibles chez le cerisier

II.5.1. Centre de Ressources Génétiques Prunus

Les conservatoires de ressources génétiques permettent de préserver la diversité existante, et constituent également des outils essentiels pour la recherche, tant pour des approches fondamentales en génétique que pour des applications plus finalisées d'innovation variétale. Les collections de ressources génétiques constituent en effet des réservoirs précieux de gènes à mobiliser. Le Centre de Ressources Génétiques (CRG) *Prunus* de l'INRA assure la conservation des principales espèces cultivées de fruits à noyau ainsi que des espèces qui leur sont apparentées. Les espèces de *Prunus* adaptées au climat méditerranéen telles que les abricotiers et les amandiers sont conservées sur le centre INRA PACA et les cerisiers, pêchers et pruniers sur le centre INRA de Bordeaux-Aquitaine. Depuis janvier 2014, la gestion du CRG *Prunus* est assurée par l'Unité Expérimentale Arboricole (UEA). Les collections du CRG *Prunus* regroupent des collections dites patrimoniales² et des collections scientifiques³, et occupent une surface de 22 ha en verger et 1500 m² en serre « Insect-proof ». Elles

² Collections nationales, collections de ressources génétiques appelées « INRA » regroupant toute accession cultivée française ou étrangère de l'espèce considérée et les collections d'espèces apparentées aux espèces cultivées

³ Famille de cartographie, haploïdes doublés...



Figure 28. Collection « INRA » pêcher, Collection nationale prunier et Collection nationale cerisier (de gauche à droite)



Figure 29. Diversité observée au sein des collections.
(A) Fleurs (Collection d'espèces apparentées au cerisier)
(B) Feuilles (collection d'espèces apparentées au prunier)
(C) Fruits (Collection nationale cerisier)

comprennent au total 8 espèces de *Prunus* cultivés et 33 espèces apparentées aux *Prunus* ce qui représente 2022 accessions. Une grande partie de ce matériel est constituée de variétés traditionnelles et modernes d'intérêt agronomique d'origine française et de variétés d'intérêt agronomique d'origine étrangère (**Figure 28, Figure 29 et Tableau 5**).

			-
	Collection nationale	Collection « INRA »	Espèces apparentées
Prunus avium	142	255	
Cerisier doux	145	255	
Prunus cerasus	20	56	84
Cerisier acide	50	50	04
Prunus × gondouinii	0	1	
Cerisier intermediaire	7	4	

Tableau 5. Composition de la collection de ressources génétiques Cerisier

II.5.2. Ressources génomiques

Au début de la thèse, très peu de ressources génomiques étaient disponibles chez le cerisier. Pour cette raison, le génome du pêcher (Verde *et al.*, 2013), de très grande qualité, a été utilisé pour la recherche de séquences homologues aux gènes décrits dans d'autres espèces et pour la localisation *in silico* des gènes étudiés. Le séquençage du cerisier a été initié en 2013. Concernant les ressources liées au transcriptome du cerisier, un unigène et des données de RNAseq ont été obtenus au cours de la thèse. Les informations issues du séquençage du génome et du transcriptome du cerisier doux offrent de nouvelles possibilités pour l'étude de l'expression et de la structure des gènes impliqués dans la floraison.

II.5.2.1. Le génome du cerisier

La taille du génome du cerisier est relativement petite, environ 338Mb (Arumuganathan & Earle, 1991; Dickson *et al.*, 1992). Au cours de l'année 2013, le séquençage du génome du cerisier a été initié à partir de la variété Stella (**Tableau 6**) (Carrasco *et al.*, 2013).

Data Type	Amount	Coverage (x)	Genome Size
454-single	1 Gb	4.44	~225Mb
454-8 kb paired	63.7 Mb	0.28	
454-20 kb paired	116.5 Mb	0.52	
Illumina (56 bp)	556 Mb	2.47	
Illumina (100 bp)	17.2 Gb	76.4	
PacBio	21.2 Mb	0.09	
Total	18.78 Gb	83.5	

Tableau 6. Données du séquençage du génome du cerisier (Carrasco et al., 2013).



Figure 30. Schématisation de la réalisation du catalogue de gènes exprimés chez le cerisier (Le Dantec *et al.*, 2012).

Toutefois, les métriques de l'assemblage et l'assemblage lui-même ne sont pas encore disponibles. La disponibilité du génome du cerisier et les analyses de génomiques comparatives entre le cerisier doux et les autres membres de la famille des *Rosaceae*, ainsi que des plantes modèles, devraient permettre l'identification de gènes impliqués dans des caractères d'intérêt agronomique tels que la floraison et ainsi permettre de définir plus rapidement des marqueurs moléculaires associés aux variations phénotypiques de ces caractères (Carrasco *et al.*, 2013; Koepke *et al.*, 2013).

II.5.2.2. Transcriptomique cerisier

Grâce aux nouvelles technologies de séquençage, l'étude de l'ensemble des transcrits (transcriptome) présents dans un échantillon biologique est devenue une partie intégrante des approches en génomique fonctionnelle. Le RNAseq permet non seulement de réaliser un catalogue de gènes exprimés mais aussi de quantifier l'expression des gènes et de déterminer la structure de chaque transcrit (Wang, Z *et al.*, 2009). Les données RNAseq sont aussi utilisées pour l'annotation des génomes de novo. L'analyse du transcriptome permet, par sa haute résolution, d'identifier des sites d'initiation de la traduction ou d'épissages alternatifs.

Catalogue de gènes exprimés du cerisier

Afin d'obtenir un panel de gènes de cerisier (unigènes ou atlas de gènes), pour les études fonctionnelles et les stratégies de gènes candidats, une banque d'ADN complémentaire (ADNc) normalisée a été préparée à partir de 5 tissus (bourgeons, feuilles, fleurs, fruits et tiges) provenant de la variété 'Regina'. Le pyroséquençage 454 (454 GS FLX Titanium, Roche) de cette banque a généré 1.175.627 séquences d'environ 330 paires de bases après nettoyage (**Figure 30**) (Le Dantec *et al.*, 2012).

Le clustering et l'assemblage de ces séquences ont généré un total de 19 574 contigs et 149 688 singletons. Après annotation fonctionnelle, un portail web a été créé pour interroger la base de données du transcriptome de *Prunus avium*. Ce transcriptome annoté constitue une ressource polyvalente pour la sélection des gènes candidats sur la base de l'annotation fonctionnelle et pourra être utilisé comme référence pour la cartographie de courtes séquences dans les études d'expression différentielle par RNAseq.

Analyse d'expression différentielle par RNAseq

Le RNAseq permet de comparer l'expression des gènes entre conditions/échantillons. Cette technologie est utilisée par Alkio *et al.* (2012) pour l'identification des gènes impliqués dans la formation de la membrane cuticulaire du fruit à partir de fruits de la variété 'Regina'.

Population	Type (No. of	No. of	Marker types	Linkage	Total	Longest	Reference
1	individuals)	markers on the	1	groups	distance (cM)	gap (cM)	
		map					
P. avium 'Emperor Francis'	Microspore-	89	RAPD	10	503	27	Stockinger et al (1996)
	derived calli						
P. avium 'Napoleon' $\times P$.	F ₁ (63)	34	isozyme	7	174 r.u. ⁽¹⁾	24 r.u.	Bošković & Tobutt (1998)
incisa E621							
D minum (Nanoleon' × D	F. (01)	177	isozyma SCPs	X	680	10.7	Clarke at al (2000)
nippointca F1292		7/1	gene-derived	þ	000	7.7.1	VIIIIN CI UI. (2007)
P. avium 'Regina' (R) ×	F ₁ (133)	R: 68	SSRs	11	639	26	Dirlewanger et al. (2004)
'Lapins'(L)		L: 54		6	495	30)
P. avium NY 54 (NY) ×	F ₁ (190)	EF: 144	SSRs, AFLPs,	8	711	25	Olmstead et al (2008)
'Emperor Francis' (EF)	×.	NY: 91	gene-derived	8	565	33	
P. avium Consensus sweet	R×L: F1 (101)	144	SSRs et SNPs	8	779.4	46.5	Cabrera et al. (2012)
cherry linkage map	NY×EF: F1 (167)						
R×L; NY×EF; 'Namati'	Na×K: F1 (80)						
$(Na) \times 'Krupnoplodnaya'$	Na×S: F1 (76)						
(K); Na × 'Summit' (S)							
P. avium 'Black tartarian'	F ₁ (89)	BT: 384	SSRs et SNPs	8	719.4	14	Klagges et al. (2013)
$(BT) \times 'Kordia' (K)$		K: 275			788	18.5	
<i>P. avium</i> 'Regina' (R) \times	F ₁ (121)	R: 335	SSRs et SNPs	8	619.4	14	Klagges et al. (2013)
'Lapins'(L)		L: 247			610.1	17.6	
<i>P. avium</i> 'Regina' (R) \times	F ₁ (117)	R: 142	SSRs et SNPs	8	657.6	24.1	Castède et al. (2014)
'Garnet'(G)		G: 137			823.6	51.5	
<i>P. avium</i> 'Namati' (Na) \times	F ₁ (72)	538	SNPs	8	862.1	12.1	Stegmeir et al. (2014)
F5-18-167							

Tableau 7. Cartes génétiques du cerisier doux.

 $^{\left(1\right) }$ Distance is measured in recombination units (r.u.).

L'utilisation de RNAseq a permis d'évaluer le niveau d'expression des gènes putatifs choisis et d'établir la présence de gènes impliqués dans la formation de la cuticule de cerise (Alkio *et al.*, 2014). Cet outil est aussi employé dans l'étude d'autres caractères agronomiques comme l'éclatement de la cerise (Balbontin *et al.*, 2014).

En outre, dans le cadre de l'étude de l'adaptation aux changements climatiques du cerisier doux, une analyse d'expression différentielle par RNAseq a été réalisée au laboratoire. Dixhuit librairies d'ADNc ont été générées à partir de bourgeons floraux appartenant aux variétés 'Regina' et 'Garnet' (contrastées pour les dates de levée de dormance) prélevés, au cours de la période de dormance, à trois stades distincts : l'endodormance, la levée de l'endodormance, et l'ecodormance. Ces données permettent d'une part, d'identifier le polymorphisme dans les séquences des transcrits et, d'autre part, de détecter les gènes candidats expressionnels liés au contrôle de la dormance. Une analyse approfondie est en cours pour identifier des gènes candidats expressionnels.

II.5.2.3. Puce à ADN 'RosBREED 6K Cherry SNP'

Le consortium international RosBREED SNP (IRSC) a soutenu le développement de puces à ADN Infinium ® II WGG sur cerisier (Peace *et al.*, 2012). Cette puce, RosBREED 6K Cherry SNP v1, regroupe 6000 SNP issus de l'analyse de 16 génotypes de cerisier doux et 8 génotypes de cerisier acide. On y retrouve 4180 SNP issus du cerisier doux, 1551 SNP issus du cerisier acide, 227 marqueurs RosCOS. Cette puce atteint une couverture du génome de 2,9 x en moyenne par variété. Elle est largement utilisée dans les études génétiques et en particulier pour la construction de cartes génétiques haute densité (Klagges *et al.*, 2013).

II.5.2.4. Cartes de liaisons génétiques

Le développement des cartes de liaisons génétiques est un outil majeur pour les études de déterminisme génétique de caractères d'intérêt agronomique et pour la sélection assistée par marqueurs (SAM) de plantes pérennes telles que le cerisier, qui ont de longues périodes d'élaboration de nouvelles variétés.

La première carte génétique du cerisier doux a été développée par Stockinger *et al.* (1996) (**Tableau 7**). Une carte couvrant 503 cM constituée de 89 marqueurs sur 10 groupes de liaison a été obtenue en utilisant des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) à partir de cals haploïdes issus de la variété 'Empereur Francis'. Par la suite, d'autres cartes ont été développées à l'aide de marqueurs isozymes et interspécifiques sur des descendances F_1 issues des croisements 'Napoleon'× *P. incisa* E621 and 'Napoleon' × *P. nipponica* F1292 (Boskovic & Tobutt, 1998).

Cartes	Caractère	Groupe de liaison	Référence
FF×NY	Y	3, 8	Sooriyapathirana et al. (2010)
	Skc	3 , 6	Sooriyapathirana et al. (2010)
	BD	1, 2, 3, 4 , 5, 6, 7	Dirlewanger et al. (2012)
		1, 2, 4 , 5, 8	Castède et al. (2014)
R×L	MD	1, 4 , 5	Dirlewanger et al. (2012)
	Fc	1, 2, 4, 5, 6, 7	Quero-García et al. (2012)
	Ff	1, 2 , 3, 4, 5, 8	Quero-García et al. (2012)
		1, 2 , 3, 4, 5, 6, 8	Campoy <i>et al.</i> (2014)
	Fw	1, 2 , 3, 4, 5, 6	Quero-García et al. (2012)
		1, 2 , 3, 5, 6, 7	Campoy <i>et al.</i> (2014)
	CR	1, 2, 4 , 6, 7	Castède et al. (2014)
R×G	HR	1, 3, 4 , 6, 8	Castède et al. (2014)
	BD	1, 2, 3, 4 , 6, 7, 8	Castède et al. (2014)
	Ff	2, 3, 5 , 6, 7, 8	Campoy <i>et al.</i> (2014)
	Fw	1, 2 , 3, 4, 5, 6, 8	Campoy <i>et al.</i> (2014)
Consensus sweet cherry linkage map	Fw	1, 3, 6	Rosyara et al. (2013)
Na×F5-18-167	cls	4	Stegmeir et al. (2014)

Tableau 8. QTL détectés chez le cerisier doux

Les QTLs à effet majeur sont notés en gras. BD : date de floraison ; cls : résistance au Cherry leaf spot (CLS) ; CR : besoins en froid ; Fc : éclatement du fruit ; Ff : fermeté du fruit ; Fw : poids du fruit ; HR : besoins en chaud ; MD : date de maturité ; Skc :couleur de la peau du fruit ; SSC : matières sèches solubles ; Y : couleur de la chair du fruit.

Des cartes génétiques partielles ont été développées à partir de 133 descendants F_1 issus du croisement 'Regina' × 'Lapins' (Dirlewanger *et al.*, 2004b). Ces cartes présentaient 30 et 28 marqueurs SSR en commun avec la carte *Prunus dulcis* 'Texas' × *Prunus persica* 'Earlygold' (T×E). Ces cartes confirment le niveau élevé de synténie et la forte colinéarité rapportés chez les *Prunus* (Joobeur *et al.*, 1998; Dirlewanger *et al.*, 2004a; Dirlewanger *et al.*, 2004b; Lambert *et al.*, 2004; Dondini *et al.*, 2007; Olmstead *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 2009; Dirlewanger *et al.*, 2012).

La majorité des cartes génétiques de cerisier ont été construites à l'aide de marqueurs moléculaires tels que les marqueurs isoenzymes, AFLP et SSR. L'arrivée d'une nouvelle génération de technologies de séquençage, à haut débit et bas prix, a permis de générer efficacement un grand nombre de marqueurs de type SNP et de construire des cartes génétiques plus denses.

Cabrera *et al.* (2012) ont construit une carte consensus cerisier à partir de quatre descendances en utilisant des marqueurs RosCOS, SNP et SSR. Les marqueurs moléculaires RosCOS (Rosaceae Conserves Orthologous Set) correspondent à un ensemble de séquences, issues de gènes orthologues à ceux d'*Arabidopsis* et conservés chez les *Rosaceae* (Cabrera *et al.*, 2009).

Klagges *et al.* (2013) réalisent, à partir de la puce « RosBREED 6K Cherry SNP », des cartes génétiques de haute densité pour les croisements 'Black Tartarian' × 'Kordia' (BT×K) et 'Regina' × 'Lapins' (R×L). Elles ont été établies à partir des familles F_1 intra-spécifiques de 89 individus pour BT×K et de 121 individus pour R×L. Au total, 723 et 687 marqueurs ont été positionnés sur les cartes BT×K et R×L, respectivement. Ces marqueurs couvrent, pour BT×K, un total 752,9 cM soit 1,1 cM par marqueur et, pour R×L, 639,9 cM soit 0,9 cM par marqueur. De plus, une carte pour le croisement 'Regina' × 'Garnet' a été réalisée dans le cadre de cette thèse (Castède *et al.*, 2014).

II.5.2.5. Déterminisme génétique de caractères complexes

Pour répondre aux attentes des producteurs, de nombreuses études génétiques de caractères complexes (Quantitative Trait Locus, QTL) se sont intéressées aux critères liés à la qualité du fruit tels que le poids et la fermeté du fruit (Rosyara *et al.*, 2013; Campoy *et al.*, 2014), la tolérance à l'éclatement (Quero-García *et al.*, 2012), la couleur de la chair et de la peau (Sooriyapathirana *et al.*, 2010) (**Tableau 8**).

Cependant, suite aux perturbations dues aux changements climatiques, des études sur la phénologie du cerisier et la résistance à certains pathogènes ont vus le jour. En 2012, Dirlewanger *et al.* (2012) réalisent, à partir de la famille RxL, une première détection de QTL

pour deux caractères phénologiques, la date de floraison et la maturité. La complexité de ces caractères est déjà observable. En effet un grand nombre de QTL sont détectés sur l'ensemble des groupes de liaison (**Tableau 8**). Ces données seront en partie précisées dans cette thèse (chapitre III partie I ; Castède *et al.* (2014)).

III. La floraison

Chez les plantes, le passage de la croissance végétative à un état reproductif, transition marquée par l'induction florale, est une étape cruciale du développement. Durant la phase végétative, les méristèmes végétatifs produisent les feuilles et tiges nécessaires à l'accumulation de réserves suffisantes pour conduire à terme la croissance de la plante. En fonction du génotype de la plante et des conditions environnementales, des facteurs génétiques et moléculaires induisent l'entrée de méristèmes végétatifs compétents (apte à recevoir les signaux d'induction florale) dans un état reproductif (Lawson & Poethig, 1995). Ces méristèmes deviennent des méristèmes inflorescentiel qui produiront les fleurs. Le succès de cette reproduction sexuée dépend à la fois de l'accumulation suffisante de réserves mais aussi d'une phase reproductive synchrone avec des conditions environnementales optimales pour la floraison et la fructification.

Chez les angiospermes, division la plus importante du règne végétal (plus de 250 000 membres connus), la floraison est considérée comme un avantage biologique qui a permis, par le brassage génétique, d'aboutir à une grande diversité (Krizek & Fletcher, 2005). Cet évènement crucial pour la plante peut suivre deux stratégies différentes (Amasino, 2009). Chez les plantes monocarpiques, toutes les annuelles et certaines pérennes telles que l'agave (*Agave sp.* L.) et le bambou (*Bambuseae sp.* Kunth ex Dumort.), la transition florale est unique, irréversible (Battey & Tooke, 2002). Cette inflorescence abondante sera alors suivie de la senescence de la plante entière. Chez les plantes polycarpiques, qui représentent la majorité des plantes pérennes, cet évènement est réversible et ne concernera qu'une partie des méristèmes végétatifs (Tooke *et al.*, 2005). Il se répètera en alternance avec des phases de croissance végétative tout le long de la vie de la plante. La différence entre les modes de floraison, monocarpique et polycarpique, va contribuer aux différences dans leur mode de vie. La forte plasticité de la floraison, chez les plantes polycarpiques, en fait un caractère d'intérêt agronomique notamment dans la sélection de variétés mieux adaptées aux futures conditions climatiques.



Figure 31. Voies de signalisation de la floraison chez Arabidopsis (Srikanth & Schmid, 2011).

Les flèches représentent l'activation des composants et ceux avec une barre perpendiculaire représentent la répression. les gènes sont indiquées par des rectangles verts, les miARNs sont en rouges et les protéines sont indiquées pas des ovales oranges.

III.1. La floraison chez les annuelles : cas d'Arabidopsis

La floraison des plantes annuelles est contrôlée par de nombreux signaux exogènes, liés à l'environnement (ensoleillement, pluviométrie, température), et endogènes propres à la plante (facteurs internes, âge). L'intégration de ces différents signaux par des mécanismes de régulation fins et complexes permet que l'initiation florale et la floraison se déroulent au cours de la période la plus favorable possible. Ces mécanismes reposent sur différentes voies de signalisation qui sont intégrées de façon quantitative et conduisent à l'induction florale du méristème végétatif. De nombreuses études génétiques et moléculaires menées sur les espèces modèles et en particulier sur *Arabidopsis* ont permis l'identification des voies de signalisation impliquées et des gènes qui les contrôlent. Quatre voies principales sont actuellement clairement définies : photopériode, vernalisation et température, gibbérellines et voie autonome (**Figure 31**) (Mouradov *et al.*, 2002; Horvath, 2009; Amasino, 2010; Srikanth & Schmid, 2011; Andres & Coupland, 2012; Andrés *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2014). Ces quatre voies contrôlent de façon quantitative des cibles communes dont les gènes d'intégration florale qui activent les gènes impliqués dans le développement reproductif (Srikanth & Schmid, 2011).

Les principaux acteurs des différentes voies de signalisation seront présentés dans les parties suivantes.

III.1.1. La voie de la réponse à la photopériode.

Chez de nombreuses espèces dites de jours longs ou de jours courts, l'initiation florale et la floraison sont contrôlées par la longueur des jours également appelée photopériode. Chez *Arabidopsis*, dont la transition florale est activée de façon facultative par les jours longs, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la capacité des feuilles à percevoir la longueur des jours (Knott, 1934; Song *et al.*, 2013). Le modèle le plus communément accepté est le modèle de coïncidence externe, basé sur la coïncidence entre un rythme interne (l'horloge circadienne) et un signal externe (lumière) dans certaines conditions qui induit l'initiation florale (**Figure 32**) (Lagercrantz, 2009).

L'adaptation des organismes aux cycles qui rythment la vie sur terre est passée par l'évolution d'une horloge interne qui optimise les interactions de la plante avec son environnement. Cette horloge circadienne, qui fonctionne sur un rythme d'environ 24 heures, est un régulateur essentiel du métabolisme et de l'expression des gènes (Harmer, 2009; McClung & Gutiérrez, 2010; Fogelmark & Troein, 2014). Son fonctionnement repose sur trois éléments principaux : (i) la synchronisation avec l'environnement grâce à la perception et transmission de signaux




La fonction des facteurs clé de l'horloge circadienne, qui induit l'expression des gènes de floraison, est régulée par la lumière, par conséquent, la floraison est accélérée lorsque l'expression de ces facteurs, en fin d'après-midi, coïncide avec la présence de lumière du jour.





Les Boîtes jaunes et grises indiquent des protéines surtout actives pendant le jour et la nuit, respectivement. Les lignes pleines indiquent la régulation transcriptionnelle ; les lignes pointillées, les interactions protéine-protéine ; Les flèches, l'activation ; les barres, la répression ou dégradation. Les lignes bleus indiquent les ajouts faits sur l'ancien modèle, la verte indique une interaction hypothétique, et la gris pâle indique une interaction hypothétique dans l'ancien modèle. Les cases bleu clair montrent les trois modules principaux de l'horloge. La foudre et les cercles jaunes symbolisent l'action de la lumière au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, respectivement.

exogènes (lumière ou température par exemple), (ii) l'oscillateur central qui génère et maintient la rythmicité des (iii) mécanismes en aval, qui connectent l'oscillateur aux différents processus physiologiques et métaboliques qu'il contrôle.

Chez Arabidopsis, la perception de la lumière se fait via les photorécepteurs : cryptochromes, CRYPTOCHROME 1 et 2 (CRY1, CRY2) et phytochromes, PHYTOCHROMES A à E (PHYA à PHYE) (Zhou et al., 2007). Le signal est ensuite transmis à l'horloge circadienne par l'activation spécifique de gènes clés de l'oscillateur central. Des études récentes ont permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le fonctionnement de l'horloge chez les plantes. A l'heure actuelle, plus de 20 éléments de l'horloge ont été identifiés chez Arabidopsis et il a été mis en évidence que l'architecture complexe de l'oscillateur central reposait sur de nombreuses boucles de rétro-contrôle interconnectées (Hsu & Harmer, 2014). Parmi les principaux gènes impliqués, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) et LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) sont deux facteurs de transcription MYB exprimés le matin et qui répriment le gène TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1 ou PRR1-PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1), exprimé le soir. TOC1 active directement l'expression de CCA1 et LHY, formant ainsi la première boucle de rétrocontrôle décrite (Figure 33) (Alabadi et al., 2001; Lau et al., 2011; Hsu & Harmer, 2014). Ces trois gènes ont été longtemps considérés comme les composants du noyau central permettant l'oscillation journalière de l'horloge puisque la perte de fonction pour un seul d'entre eux modifiait le rythme et le fonctionnement de l'horloge. De même, leur surexpression aussi provoquait une perte complète de rythmicité (Schaffer et al., 1998; Wang & Tobin, 1998; Nagel & Kay, 2012). La découverte et l'étude de nouveaux composants ont conduit à la complexification du réseau de boucles de rétrocontrôle interconnectées constituant le moteur central de l'horloge (Figure 33) (Pruneda-Paz & Kay, 2010).

En particulier, d'autres composants de l'horloge, tels que le gène *GIGANTEA* (*GI*), sont directement impliqués dans la floraison en régulant cycliquement l'expression du gène *CONSTANS* (*CO*), qui est un gène clé pour le contrôle de l'initiation par la photopériode (**Figure 34**) (Suarez-Lopez *et al.*, 2001).

Les interactions entre la photopériode, l'horloge circadienne et l'expression du gène *CO* sont critiques pour promouvoir l'initiation florale en jours longs. Le modèle de coïncidence externe (Pittendrigh, 1964; Thomas & Vince-Prue, 1997) propose que le signal photopériode favorable n'est généré que lorsqu'une phase externe spécifique (ici la lumière du jour) coïncide avec la phase interne appropriée d'un élément contrôlé par l'horloge circadienne (ici



Figure 34. Rythmes circadiens de CO chez *Arabidopsis* en jours courts (à droite) ou jours longs (à gauche), et leur coïncidence avec la lumière ambiante (A, B) ou le rythme de GI (C, D) (Yeang, 2013). Les courbes de CO sont issues de Suárez-López et al. (2001), celles de GI de David et al. (2006). Deux cycles répétés de 24h sont présentés dans chaque cas. Chaque courbe de CO a été normalisée par l'attribution d'une valeur de 100 pour la valeur la plus élevée. Chaque courbe de GI a été normalisée par l'attribution d'une valeur de 50 pour la lecture la plus élevée. Zones non ombrées et ombrées dénotent les périodes de lumière et l'obscurité, respectivement. Zt, heures (zeitgeber).

l'expression de *CO*). A l'arrivée des jours longs, l'expression circadienne de *CO* et l'accumulation spécifique de la protéine CO en jours longs permet l'activation de l'expression des gènes intégrateurs de l'initiation florale *FLOWERING LOCUS T (FT)* au niveau des cellules compagnes du phloème dans les feuilles et *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* (Imaizumi & Kay, 2006; Turck *et al.*, 2008).

III.1.2. La voie de la réponse à la température

Hormis la photopériode, L'initiation florale et la floraison sont également sous contrôle des variations de température. La majorité des études sur les effets de la température ont porté sur la réponse à la vernalisation. Cependant, des approches plus récentes ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de la température ambiante.

III.1.2.1. La vernalisation

La vernalisation désigne le processus selon lequel une période de froid perçue au niveau des méristèmes végétatifs est nécessaire pour induire le passage d'un stade végétatif au stade reproductif (Boss *et al.*, 2004). Cette voie de signalisation est principalement régulée par le gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, qui est un inhibiteur du gène intégrateur *FT*.

Au cours de ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes liés à la vernalisation en identifiant plusieurs gènes impliqués dans la régulation épigénétique de *FLC*. De nombreuses études ont montré que les changements dynamiques de la chromatine au niveau du gène *FLC* liés à la modification des histones sont un aspect essentiel de la vernalisation chez *Arabidopsis*.

Les études, menées sur des variants naturels d'Arabidopsis, ont montré que les accessions, nécessitant une période de vernalisation pour fleurir, présentaient deux gènes dominants, *FRIGIDA (FRI)* et *FLC* (Clarke & Dean, 1994; Michaels & Amasino, 1999; Johanson *et al.*, 2000; Sheldon *et al.*, 2002; Gazzani *et al.*, 2003). *FRI* code pour une protéine avec des domaines coiled-coil (faisceau d'hélices) et régule positivement l'expression de *FLC*. Le mutant *fri*, ainsi que celui de *flc*, présente une floraison précoce et la perte des besoins de vernalisation. Le mécanisme, par lequel FRI régule l'expression de *FLC*, n'est pas encore totalement compris, mais il a été récemment montré que l'interaction de la protéine FRI avec le complexe de liaison CAP BINDING COMPLEX (CBC), à travers ses deux domaines coiled-coil, est essentielle pour la fonction FRI (Geraldo *et al.*, 2009).

Le mode d'action de FLC est mieux caractérisé que celui de FRI. *FLC* appartient à la famille des gènes MADS-box. Il est exprimé dans la feuille et le méristème végétatif, et agit en



Figure 35. Changements dynamiques de la chromatine au niveau du gène FLC durant la vernalisation (Pyo et al, 2014).

formant un complexe protéique avec *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*. Le complexe FLC/SVP réprime l'expression de gènes d'intégration *FT* dans les feuilles et *SOC1* dans le méristème apical (Li *et al.*, 2008).

Au cours d'une période prolongée de froid, l'expression de *FLC* est réprimée par les mécanismes liés aux voies de vernalisation et autonome. Des études, menées pour mieux comprendre l'impact de la vernalisation sur *FLC*, ont démontré que la régulation de *FLC* en réponse à la vernalisation est une régulation épigénétique faisant appel à différents facteurs, parmi lesquels la modification des histones et les long non coding RNA (lncRNA). Ainsi, avant la période de froid, l'expression active de *FLC* est due à sa chromatine enrichie en histone 2A.Z (H2A.Z), en histone 2B mono-ubiquitiné (H2Bub1) et en histone 3 triméthylé sur les lysines 4 et 36 (H3K4me3 et H3K36me3). Ces marques histones sont toutes associées à l'activation de la transcription d'un gène. L'exposition au froid va réduire progressivement cette activation (**Figure 35**) (He *et al.*, 2004; Pien *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009b; Tamada *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2010).

L'étude de mutants ne présentant pas de réponse à la vernalisation a permis de mettre en évidence le rôle des gènes *VERNALIZATION 1 (VRN1)*, *VERNALIZATION 2 (VRN2)*, *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)*, *VIN3-LIKE 1 (VIL1* ou *VRN5-VERNALIZATION 5)* et *PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5* dans la répression durable de l'expression de *FLC* (Chandler *et al.*, 1996; Sung & Amasino, 2004b; Greb *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2008).

Ces mutants présentent une altération de la vernalisation due à un non maintien de la répression de *FLC*. *VRN1* et *VRN2* sont deux régulateurs importants pour *FLC* (Gendall *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2002). VRN2 est une protéine nucléaire à doigt de zinc appartenant au groupe Polycomb Repressive complex 2 (PRC2) (**Figure 36**). Le groupe PRC2 est un complexe de méthyltransférase qui est responsable de la répression de l'expression génique par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Cao *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002). Chez les mutants *vrn1* et *vrn2*, on observe une répression de l'expression de *FLC* en réponse au froid, mais les niveaux de transcrits de *FLC* augmentent de nouveau avec l'élévation des températures, validant ainsi le rôle des gènes *VRN1* et *VRN2* dans le maintien de la répression de *FLC* après la période de froid. En particulier, ces gènes agissent sur les niveaux de méthylation de H3K9 et H3K27 dans la chromatine à hauteur de *FLC* pour induire une répression durable de l'expression de *FLC* (**Figure 35**) (Bastow *et al.*, 2004; Sung & Amasino, 2004a).



Figure 36. Régulation du cycle de développement chez *Arabidopsis* par les différents complexes PRC2 (Butenko, 2011).

Les trois complexes agissent à différents moments du développement et font intervenir différents acteurs qui peuvent être communs (FIE, MSI1, CLF/SWN) ou spécifique (EMF2, FIS, VRN2).



Figure 37. Régulation de *FLC* **par la vernalisation et la voie autonome (Srikanth & Schmid, 2011).** Les niveaux des transcrits de *FLC* (noir) sont tracés en fonction des différents stades de froid et par rapport à ceux de *COOLAIR* (rouge), *COLDAIR* (vert), *VIN3* (orange), et à l'action des facteurs de la voie autonome.

Durant la période de froid, le premier facteur induit est le lncRNA, *COLD INDUCED LONG ANTISENSE INTRAGENIC RNA (COOLAIR)*, qui est rapidement exprimé et va réprimer la transcription de *FLC* par silencing avant les effets de *VIN3* (**Figure 37**) (Swiezewski *et al.*, 2009). Cette répression précoce va permettre l'action des *COLD ASSISTED INTRONIC NON CODING RNA (COLDAIR)*, qui est un lncRNA. Après une période de froid prolongée, les *COLDAIR* vont alors se fixer au promoteur de *FLC* permettant le recrutement de VIN3 et du complexe PRC2 afin d'entretenir une répression durable de l'expression de *FLC* (Sung & Amasino, 2004b; Heo & Sung, 2011). VIN3 est une protéine à doigt PHD qui interagit avec VIL1 (Sung *et al.*, 2006; Greb *et al.*, 2007) afin de recruter VRN1, VRN2, et LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) au niveau de la marque H3K27me3, marque associée à l'inactivation de la transcription d'un gène, ce qui aura pour effet d'accroitre et maintenir *FLC* à l'état réprimé. Après la période de froid, l'expression de *VIN3* diminue, mais la répression de l'expression de *FLC* est maintenue par VIL1 qui reste associé au complexe PRC2 et à la chromatine (**Figure 35**).

III.1.2.2. Le rôle de la température ambiante

La réponse de la floraison à la température ambiante est diverse selon les espèces, et les génotypes. Des études menées sur différentes accessions d'*Arabidopsis* ont montré que les températures plus élevées que la normale saisonnière, favorisent la floraison (Balasubramanian *et al.*, 2006). Dans cette voie, les températures chaudes vont favoriser la floraison alors que les températures froides vont la retarder (**Figure 38**).

L'analyse de mutants *fri* et *flc* qui ne répondaient pas à cette induction thermique a permis de mettre en évidence le rôle du gène *FLOWERING LOCUS M (FLM)* dans la voie de réponse à la température (Werner *et al.*, 2005). FLM est une protéine MADS-box qui montre des similarités de séquences fortes avec FLC. L'action de FLM est associée à la sélection de sites d'épissages alternatifs affectés par induction thermique. Une protéine FLM non tronquée remplit un rôle similaire à FLC en s'associant de manière identique à SVP et en agissant comme un répresseur floral sur les promoteurs de *FT* et *SOC1* (Hartmann *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007).

De récentes analyses ont permis de mettre en évidence l'implication de la protéine nucléaire ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (ARP6) dans la réponse à la température, par le maintien de l'expression de *FLC* (Choi *et al.*, 2005; Deal *et al.*, 2005). ARP6 constitue avec ACTIN-RELATED PROTEIN 4 (ARP4) et PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1) le complexe SWR1, qui permet le remplacement de l'histone H2A par le variant H2A.Z favorise l'expression de *FLC*, mais réprime celle de



Figure 38. Régulation de la floraison par la température ambiante au cours des jours longs (en haut) et des jours courts (en bas) (Capovilla et al, 2014).

Deux sous-réseaux de régulation contrôlent la réponse à la température ambiante. Dans des conditions de jours longs (en haut), le complexe SVP/FLM- β réprime directement les activateurs floraux. Lorsque la température augmente, la version tronquée de FLM, FLM- δ , empêche la formation du complexe SVP/FLM. La protéine SVP est activement dégradée par le protéasome 26S (bleu). Dans des conditions de jours courts (en bas), la température élevée favorise la diminution du taux d'occupation des H2A.Z et la liaison de PIF4 au promoteur de *FT*. Les flèches et les barres indiquent l'activation et la répression, respectivement. Les flèches et barres en pointillés indiquent un effet faible. La taille des polices indique l'abondance.

FT. En jours courts, la température élevée favorise la diminution du taux d'occupation des H2A.Z, ce qui conduit à la répression de l'expression de *FLC* et favorise l'expression de *FT*, en particulier via l'action de PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) (**Figure 38**) (Capovilla *et al.*, 2014).

Bien que les analyses génétiques et moléculaires aient permis l'identification de plusieurs gènes impliqués dans la réponse à la température ambiante, le mécanisme de détection des différences de température par les plantes reste encore peu connu.

III.1.3. Les autres voies de signalisation

III.1.3.1. La voie autonome

La vernalisation accélère la floraison par l'effet du froid prolongé, les protéines du complexe Polycomb répriment l'action de FLC. Parallèlement à la vernalisation, les acteurs de la voie autonome réguleraient négativement *FLC* (**Figure 37**), soit par régulation de l'ARN, soit par régulation épigénétique. La voie autonome active indirectement la floraison en rendant la plante sensible à d'autres stimuli activateurs comme la photopériode ou la voie des gibbérellines (Simpson, 2004).

Les analyses de mutants présentant un retard de floraison, indépendant de la photopériode, mais dont les effets sont annulés par la vernalisation, ont permis d'identifier un groupe de gènes dont l'objectif commun est la régulation de *FLC*. Ce groupe inclut les gènes *LUMINIDEPENDENS (LD), FCA, FY, FPA, FLORAISON LOCUS D (FLD), FVE, FLORAISON LOCUS K (FLK)* (Lim *et al.*, 2004), et *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)* (Lu *et al.*, 2011). Ces gènes ont été regroupés sous la voie autonome et agissent collectivement en parallèle à la voie de vernalisation.

Deux classes de protéines sont notables dans la voie autonome. Certaines seront impliquées dans la transcription, comme FCA, FPA, et FLK qui contiennent des motifs de liaison à l'ARN et FY est un facteur de terminaison de la transcription très conservé, appartenant à la famille des CPSF (CLEAVAGE / POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR). D'autres sont impliquées dans la modification de la chromatine. FLD et REF6 sont des enzymes de type déméthylases (He *et al.*, 2003; Noh *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007). Les fonctions biochimiques prédites pour ces protéines sont en accord avec un modèle selon lequel les protéines de la voie autonomes fonctionnent au moyen de couplage avec l'ARN et de modification de la chromatine (Kim *et al.*, 2009b; Michaels, 2009; Liu *et al.*, 2010).



Figure 39. Voie des gibbérellines (Galvão & Schmid, 2014).

Représentation de l'intégration de la voie des gibbérellines (GA) dans les feuilles (gris clair) et à le méristème (gris foncé).

III.1.3.2. La voie des gibbérellines

Les gibbérellines (GA) sont des molécules diterpénoïdes issues de la voie de biosynthèse des terpénoïdes (Grennan, 2006) impliquant différentes enzymes. Ainsi, les oxydases *GIBBERELLIN 20-OXIDASE (GA20ox)* et *GIBBERELLIN 3-OXIDASE (GA3ox)* vont permettre la maturation des formes actives des gibbérellines alors que *GIBBERELLIN 2-OXIDASE (GA2ox)* les inactive (Yamaguchi & Kamiya, 2000). Ces phytohormones, impliquées dans le développement végétal (Davies *et al.*, 1985; Foster *et al.*, 2007), favorisent également la floraison en jours courts chez *Arabidopsis* en activant, au niveau du méristème, la transcription des gènes d'identité florale *FT*, *LFY*, et *SOC1* (**Figure 39**) (Blazquez *et al.*, 1998; Daviere & Achard, 2013).

III.1.3.3. Les autres voies endogènes

En plus des quatre grandes voies principales décrites ci-dessus, des études démontrent le rôle des miR156 et 172 dans le changement de phase végétative à la phase reproductive. Le fait que miR156 est plus abondant dans le stade juvénile qu'au stade adulte, et inversement pour miR172, suggère une action complémentaire entre miR156 et miR172.

La surexpression de *miR156* régule négativement plusieurs *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, et retarde à la fois la transition de la phase juvénile à adulte mais aussi la transition phase végétative à reproductive. Les SPL réguleraient la floraison en fonction de l'âge de la plante (Wang, J-W *et al.*, 2009).

Chez *Arabidopsis*, les cibles de *miR172* codent des facteurs de transcription de la famille *AP2*-like, tels que *APETALA 2 (AP2)*, *SCHLAFMUTZE (SMZ)*, *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*, *TARGET OF EAT 1, 2* et *3 (TOE1, TOE2, et TOE3)*. *miR172* favorise la voie de la photopériode indépendant de CO. Le module *miR172-AP2* régule non seulement *FT* dans les feuilles, mais réprime également d'autres régulateurs de la floraison agissant en aval de *FT* (**Figure 31**) (Mathieu *et al.*, 2009).

Récemment, le *TREHALOSE-6-PHOSPHATE* (*T6P*) a été décrit comme un indicateur des stocks d'hydrates et de carbone dans les plantes. *T6P* agit comme un signal qui coordonne l'induction de floraison en régulant l'expression d'intégrateurs clés. La perte de *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1* (*TPS1*) provoque une floraison très tardive. Ceci suggère que *TPS1* est nécessaire pour la mise en place rapide de la floraison. La voie des sucres contrôlerait l'expression de *SPL3/4/5* dans le méristème apical, soit directement, soit par l'intermédiaire de *miR156* (Bernier & Perilleux, 2005; Wahl *et al.*, 2013).

III.1.4. Intégration des différentes voies

Ces différentes voies de signalisation régulent la floraison en réponse aux signaux endogènes et exogènes, et convergent vers la régulation de l'expression d'un même ensemble de gènes, les gènes d'intégration florale qui conduisent à l'induction des gènes d'identité florale, groupe comprenant entre autre *APETALA1 (AP1)*, *CAULIFLOWER (CAL)* et *FRUITFULL (FUL)* (Kieffer & Davies, 2001; Lohmann & Weigel, 2002). Ces gènes permettent l'intégration des signaux résultants de chaque voie et les convertissent en un solde de stimulations quantitatives pour répondre à la question oui / non de l'initiation florale (Simpson & Dean, 2002; Parcy, 2005). Plusieurs intégrateurs ont déjà été identifiés comme *FT, FD, TERMINAL FLOWER* 1 (*TFL1*), *LEAFY (LFY)* et *SOC1*.

FT est un intégrateur floral majeur qui code pour une protéine de la famille PEBP / RKIP (Raf kinase inhibitor protein) (Kobayashi *et al.*, 1999). FT joue le rôle d'un signal à longue distance entre les feuilles et les méristèmes, *via* le phloème. Une fois dans le méristème végétatif, FT va induire une reprogrammation de la transcription suite à sa liaison avec le facteur de transcription bZIP, FLOWERING LOCUS D (FD). FD est exprimé faiblement relativement tôt chez la plante, mais son niveau d'expression augmente dans le méristème au moment de la transition florale. Le complexe FT/FD va alors initier la floraison par l'activation des gènes d'identité florale tel que API et d'autres intégrateurs floraux tel que *SOC1*.

Le complexe FLC/SVP réprime l'expression de ces intégrateur floraux, *FT*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *FD* et *SOC 1* (Lee *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 2009).

Antagoniste de *FT*, *TLF1*, membre de la famille des PEBP (phosphatidylethanolaminebinding protein), est un répresseur spatio-temporel de l'identité florale qui permet le maintien de certains méristèmes à l'état végétatif. La protéine TLF1 se déplace de son lieu d'expression, les cellules centrales du méristème, vers les cellules périphériques (Ratcliffe *et al.*, 1999; Conti & Bradley, 2007) et réprime les gènes d'identité florale *AP1* en entrant en compétition avec FT dans sa liaison avec FD. Au niveau du méristème floral, *AP1* et *LFY* répriment l'expression de *TLF1* (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2006; Lifschitz *et al.*, 2014).

III.2. La conservation des voies de signalisation chez les pérennes

La mise en évidence chez *Arabidopsis* de gènes impliqués dans la floraison a permis la recherche de gènes orthologues chez d'autres espèces. Certains de ces gènes et leurs fonctions ont été identifiées chez des espèces cultivées. Malgré des différences notables dans le cycle de vie et les mécanismes impliqués dans la floraison, les acteurs principaux de la transition florale chez les plantes angiospermes semblent les mêmes, à l'exception du gène *FLC*, gène propre aux Brassicacées (Tan & Swain, 2006; Danilevskaya *et al.*, 2008).

Réponse à la photopériode

Le contrôle de la voie de la photopériode à travers le gène *CO* semble largement conservé chez un grand nombre de plantes (Turck *et al.*, 2008). Des travaux sur l'algue verte Chlamydomonas ont montré l'apparition précoce au cours de l'évolution de gènes *CO-like* ayant une fonction régulatrice dans la voie de la photopériode (Serrano *et al.*, 2009).

Chez les agrumes, l'expression de *FT* augmente durant l'automne et l'hiver, correspondant à la période d'induction florale, tandis que les homologues de *LFY* et *SEP* vont augmenter du début du printemps jusqu'à la floraison.

Chez le peuplier (*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray), des gènes homologues à CO et FT ont été isolés. Comme leur homologue, ils servent de régulateurs de la transition florale, et jouent un rôle important dans l'induction de la floraison. FT diminue avec l'arrivée des jours courts provoquant un arrêt du développement de la plante. Il augmente suite à la levée de dormance induite par le froid. Chez une autre espèce de peuplier, *Populus deltoides* (W. Bartram ex Marshall), deux gènes FT, FT1 et FT2, ont été identifiés, chacun possède une fonction importante dans la dormance des bourgeons et la floraison. FT1 bloquerait la croissance lors des jours courts, tandis que FT2 permettrait que la floraison se déroule au bon moment. A la différence d'*Arabidopsis*, une quantité seuil de FT serait nécessaire pour l'induction florale et la poursuite du développement floral chez les plantes pérennes.

Réponse aux températures

Ce procédé quantitatif est essentiel pour les plantes pérennes, les parties fragiles, telles que les méristèmes, seront protégées des froids hivernaux, et la floraison pourra alors se dérouler dans des conditions favorables à la phase reproductive (Henderson *et al.*, 2003).

Dans les régions tempérées, les plantes pérennes commencent leur initiation florale après la formation de nouveaux méristèmes. En hiver, le développement des bourgeons floraux est bloqué. Le retour de conditions optimales au printemps permet la floraison. Les basses



Figure 40. Mécanismes de régulation de la floraison et de la dormance des bourgeons (Horvath 2009).

températures sont généralement l'une des plus importantes contraintes environnementales pour l'induction florale. Cependant, l'action de la voie de la vernalisation est très controversée du fait de l'exclusivité de *FLC* pour les espèces appartenant à la famille des Brassicacées. Bien que des séquences *FLC-like* aient été identifiées, la conservation de la fonction a été très rarement mise en évidence (Reeves *et al.*, 2007; Jung & Mueller, 2009). Ainsi, en l'absence de *FLC*, les plantes pérennes ont développé des stratégies impliquant d'autres gènes remplissant une fonction similaire.

Chez la canne à sucre, le gène *BvFL1* semble être un orthologue de *FLC* capable de réprimer la floraison et restaurer le mutant nul *flc* d'*Arabidopsis* (Reeves *et al.*, 2007).

Chez les agrumes (Citrus), l'épissage alternatif du 5' UTR de gènes orthologues de *FLC* a récemment été rapporté (Zhang *et al.*, 2011). Les variants d'épissages spécifiques ont été associés à la transition de la phase juvénile à la phase adulte. L'expression de ces orthologues augmente au cours de l'hiver, et diminue au printemps et en été. La régulation de ces gènes impliquerait le gène *EARLY FLOWERING 5 (ELF5)*. De plus, l'expression d'homologues *FT* augmente au cours de la période d'induction florale, est également induite par une baisse artificielle des températures, et favorise l'induction florale.

Chez le peuplier, bien que la séquence complète du génome soit maintenant disponible, aucun homologue de *FLC* n'a été clairement identifié. Comme pour le pêcher, il est possible que des gènes différents, les membres de la sous-famille des MADS, remplissent des fonctions similaires à *FLC* (**Figure 40**). Ruonala *et al.* (2008) note que *FT* et *CENL1* sont régulés par le froid. L'expression de *FT* augmente fortement au cours de la période hivernale alors que celle *CENL1* nécessite une élévation des températures.

Autres voies de signalisation

Contrairement aux deux voies principales, la réponse à la photopériode et à la température, les composants de la voie autonome sont très largement conservés dans le règne végétal (Simpson, 2004), ce qui porterait à croire en la conservation de cette voie. Tout comme les intégrateurs floraux tels que *FT*, *SOC1*, et *LFY*, eux aussi fortement conservés (Weigel & Nilsson, 1995; Pena *et al.*, 2001; Bomblies *et al.*, 2003; Veit *et al.*, 2004; Jung & Mueller, 2009).

Le rôle des gibbérellines sur la floraison des plantes pérennes a principalement été étudié pour les arbres fruitiers, tels que la vigne, le cerisier, le pêcher, l'abricotier, l'amandier et le citronnier, chez lesquels les gibbérellines ont généralement un rôle d'inhibiteur de floraison (Wilkie *et al.*, 2008). Les mécanismes impliqués dans la voie des gibbérellines sur la floraison



Figure 41. Comparaison des voies de régulation de la floraison (Kurokura et al, 2013).

Les voies de la photopériode et de la température sont simplifiées pour mettre l'accent sur *FLC*, *FT* et les gènes jouant des rôles équivalents. Les gènes encadrés par un rectangle noir suppriment l'expression des gènes *FT-like*. Ils sont réduits au silence par la vernalisation. Chez le modèle des *Rosaceae F. vesca*, *TFL1* est exprimé sous des conditions de températures chaudes en jours longs, les températures froides répriment l'expression *TFL1*. Une régulation similaire peut exister chez d'autres espèces de *Rosaceae*. Flèches : promotion ; barre : suppression.

sont encore mal connus et semblent spécifiques à l'espèce (Boss & Thomas, 2002; Rinne *et al.*, 2011; Munoz-Fambuena *et al.*, 2012).

III.3. Voies de signalisation chez les Rosaceae

Deux des acteurs principaux de la floraison chez les *Rosaceae* seraient *FT* et *TFL1*, tous deux appartiennent à la famille de gènes qui codent pour des protéines de type PEBP (Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein) (**Figure 41**) (Danilevskaya *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble, les espèces testées jusqu'à présent montrent que l'expression de *TFL1* est maximale dans les méristèmes végétatifs, et reprime la floraison. La chute de son expression précède l'initiation florale (Mimida *et al.*, 2011b; Koskela *et al.*, 2012). Cependant, le rôle de *FT* est encore obscur (Kotoda *et al.*, 2010; Koskela *et al.*, 2012; Srinivasan *et al.*, 2012).

Plusieurs gènes homologues des gènes de vernalisation ont été retrouvés chez les *Rosaceae*, mais aucun homologue de *FLC* ont été trouvés (Mouhu *et al.*, 2009; Guitton *et al.*, 2012).

La floraison des *Rosaceae* est très affectée par la période de dormance hivernale, et surtout par le moment de la levée de dormance, qui dépend des besoins en froid spécifique à chaque génotype (Heide & Prestrud, 2005; Ruiz *et al.*, 2007; Leida *et al.*, 2012a; Leida *et al.*, 2012b). Pendant l'endodormance, qui dure 2-3 mois chez la pomme, le débourrement est réprimé, mais les méristèmes floraux continuent à se développer (Kuroda & Sagisaka, 2001). Chez la fraise, il n'y a pas de «vraie dormance», mais une «semi-dormance». L'exposition prolongée aux jours courts réduit fortement la croissance, et le froid redonne de la vigueur à la croissance (Guttridge, 1985; Sonsteby & Heide, 2006).

Chez le pêcher, les besoins en froid sont nécessaires pour la floraison (Leida *et al.*, 2012a; Leida *et al.*, 2012b). Le mutant *evergrowing (evg)* est insensible à la dormance (Werner & Okie, 1998). Ce mutant présente une délétion d'une séquence répétée en tandem de six gènes *MADS-box SVP/AGL24-like*, les gènes *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box (DAM)* (Bielenberg *et al.*, 2008). Ces gènes sont présents chez d'autres *Rosaceae* comme l'abricotier japonais (*Prunus mume* Siebold & Zucc.) (Yamane *et al.*, 2008), le framboisier (Mazzitelli *et al.*, 2007) ou le poirier japonais (*Pyrus pyrifolia* Nakai) (Ubi *et al.*, 2010). L'exposition prolongée au froid régule négativement l'expression des gènes de *DAM* et induit la rupture de l'endodormance. Récemment, il a été montré que l'inactivation de *DAM6* est précédée par des changements dans la méthylation de l'histone H3 (H3K27), comme pour *FLC* et d'autres gènes qui régulent la vernalisation chez *Arabidopsis* (Leida *et al.*, 2012b). Les études sur le pommier et le poirier démontrent la possibilité d'un contrôle hormonal de la floraison. Ainsi, la flexion de la branche latérale en position horizontale provoque une augmentation de la production de bourgeons floraux (Banno *et al.*, 1985a; Han *et al.*, 2007), suite à l'induction de cytokinine/auxine dans les bourgeons (Banno *et al.*, 1985b). Ces deux hormones induisent l'expression de *MdTFL1* dans l'apex (Mimida *et al.*, 2011a). Les gibbérellines inhibent la floraison du pommier (Tromp, 1982; Bangerth, 2009), du fraisier (Guttridge, 1985) et du rosier (Roberts *et al.*, 1999; Randoux *et al.*, 2012).

IV. Présentation de la thèse

IV.1. Un enjeu scientifique et socio-économique

Les reconstitutions et prédictions climatiques convergent pour confirmer l'accélération du réchauffement climatique. Des phénomènes météorologiques extrêmes, variations de températures accrues et irrégularités des précipitations, résultant de ces changements climatiques, peuvent avoir des impacts défavorables majeurs sur les différentes phases du cycle annuel des espèces fruitières, notamment la floraison, et entrainer une perte non négligeable de production. Dans de telles conditions, de nombreuses questions se posent. L'anticipation des effets dus aux changements climatiques et l'adaptation des espèces fruitières à ce phénomène deviennent à la fois des enjeux scientifiques mais surtout des enjeux économiques majeurs dans notre société.

Bien que le cerisier soit cultivé dans de nombreux pays de climats tempérés très variables (du sud de l'Espagne au sud de la Norvège), les recherches sur l'amélioration génétique pour des caractères liés à l'adaptation aux changements climatiques chez cette espèce sont encore très limitées. L'identification de déterminants génétiques et moléculaires impliqués dans la cinétique de floraison pourrait permettre l'optimisation de cette sélection variétale. Ainsi, le développement d'une sélection assistée par marqueurs permettant d'associer aux critères classiques liés à la qualité du fruit (poids, taille, fermeté, éclatement) des critères liés à l'adaptation aux changements climatiques (besoins en froid, besoins en chaud), pourrait faciliter le choix de géniteurs et favoriser la création de génotypes répondant aux exigences des producteurs et des consommateurs. Cette stratégie est tout particulièrement intéressante chez le cerisier, du fait de sa longue période juvénile. La production française de cerises pourrait, alors, être maintenue dans les régions traditionnelles de culture, voire se développer dans de nouvelles régions.

IV.2. Objectifs et hypothèses de travail

L'objectif principal de ce travail est l'identification de déterminants génétiques et moléculaires impliqués dans la floraison chez le cerisier doux, comme exposé au cours de l'introduction. Cet objectif se décompose en trois axes d'étude :

(1) <u>déterminer les régions génomiques impliquées dans la régulation des besoins en froid et en</u> <u>chaud, et dans le contrôle de la date de floraison</u>. Ce travail s'appuiera sur une détection de QTL. Deux familles F_1 intra-spécifiques avec un parent commun seront étudiées pour la date de floraison et la famille R×G, aux parents les plus contrastés en termes de besoins en froid et date de floraison, sera utilisée pour l'analyse des besoins en froid et en chaud. Ces résultats seront confrontés aux données recueillies sur d'autres *Prunus* tels que le pêcher (Fan *et al.*, 2010) et l'abricotier (Olukolu *et al.*, 2009), afin de confirmer l'hypothèse de travail selon laquelle il y aurait conservation des mécanismes impliqués dans la floraison chez les *Prunus*.

(2) <u>identifier des gènes candidats fonctionnels potentiellement impliqués dans la floraison</u> <u>chez le cerisier</u>. En se basant sur l'hypothèse de la conservation des acteurs de la floraison décrits chez d'autres plantes, une liste de gènes candidats sera établie. Suivant l'hypothèse de travail selon laquelle la synténie entre pêcher et cerisier est suffisamment importante pour utiliser les marqueurs communs, encadrant les QTL chez le cerisier, une localisation putative de ces gènes sera effectuée vis-à-vis du génome annoté du pêcher. Cette co-localisation avec des QTL d'intérêt sera vérifiée par la cartographie de ces gènes sur les cartes de liaisons génétiques parentales.

(3) <u>confirmer l'implication de ces gènes candidats dans la variation de nos caractères</u>. En faisant l'hypothèse que la différence de précocité observée chez les génotypes étudiés ('Regina' à floraison tardive, 'Lapins' et 'Garnet' à floraison précoce) résulte d'une expression différente de ces gènes à des stades clés de la floraison, la comparaison de leur niveau d'expression dans les bourgeons de ces génotypes contrastés, prélevés à différents stades de développement, devrait permettre d'établir une liste de gènes candidats les plus prometteurs. Ces gènes pourraient par la suite être étudiés au sein de la collection de ressources génétiques cerisier, afin d'appuyer ces résultats.

Matériel et Méthodes

Chapitre II. Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

Dans cette étude, le matériel végétal utilisé est constitué d'arbres adultes de cerisier doux (*Prunus avium*). Parents et descendances sont cultivés sur leur propres racines en verger au domaine des Jarres (Toulenne ; 44,57° Nord, 0,28° Ouest) de l'Unité Expérimentale Arboricole (UEA), INRA – centre de Bordeaux. Ces vergers sont implantés sur un terrain glaiseux, sur la rive de la Garonne, à 15 m au-dessus du niveau de la mer. Le climat est continental avec des hivers doux et une pluviométrie moyenne annuelle de 825 mm. Les caractérisations phénotypiques seront évaluées sur les arbres ou à partir de rameaux de plus de 2 ans qui seront prélevés et placés en conditions contrôlées. Les caractérisations moléculaires se feront à partir des bourgeons floraux.

I.1. Familles étudiées

Les analyses phénotypiques et génotypiques, la cartographie et les détections de QTL sont réalisées sur deux familles F_1 intraspécifiques issues de croisements contrôlés de parents hétérozygotes.

La première famille est issue du croisement 'Regina' \times 'Lapins' (R \times L) et regroupe 122 individus. Cette famille sera utilisée pour l'analyse de la date de floraison. Les deux parents, étudiés présentent des dates de floraisons contrastées et leurs descendants ségrégent pour ce caractère. Le parent femelle 'Regina' est une variété allemande de floraison tardive, 8 à 12 jours après 'Burlat' et est très productive. Le parent mâle 'Lapins' est une variété canadienne, considérée comme précoce, fleurissant 2 à 4 jours avant Burlat et de productivité moyenne.

La seconde famille est issue du croisement 'Regina' × 'Garnet' ($R \times G$) et regroupe 117 individus. Cette famille sera utilisée pour l'étude de besoins en froid et en chaud et pour la date de floraison. Les deux parents présentent des besoins en froid et des dates de floraisons très contrastées et leurs descendants ségrégent pour ces caractères. Le parent femelle 'Regina' est commun à la première population, ses besoins en froid sont relativement importants (81 portions de froid - modèle dynamique (Fishman *et al.*, 1987)). Le parent mâle 'Garnet' est une variété américaine de floraison précoce, 1 à 9 jours avant 'Burlat', avec de faibles besoins en froid (53 portions de froid - modèle dynamique). 'Regina' étant le parent femelle des deux familles, les résultats obtenus à partir de ces deux descendances pourront être comparés.

Date de prélèvements	chill portions	'Cristobalina'	'Garnet'	'Lapins'	'Regina'
13/10/2011	1,79	C1	G1	L1	R1
02/11/2011	5,54	C2	G2	L2	R2
23/11/2011	12,55	C3	G3	L3	R3
28/11/2011	17,51	C4	G4	L4	R4
05/12/2011	21,51	C5	G5	L5	R5
09/12/2011	24,52	C6	G6	L6	R6
16/12/2011	29,55	C7	G7	L7	R7
23/12/2011	35,49	C8	G8	L8	R8
30/12/2011	40,69	C9	G9	L9	R9
09/01/2012	46,71	C10	G10	L10	R10
13/01/2012	48,59	C11	G11	L11	R11
19/01/2012	52,96	C12	G12	L12	R12
27/01/2012	58,62	C13	G13	L13	R13
03/02/2012	62,43		G14	L14	R14
14/02/2012	67,26	C15	G15	L15	R15
22/02/2012	72,92			L16	R16
29/02/2012	77,93	C17	G17	L17	R17
08/03/2012	83,4			L18	R18
15/03/2012	87,64	C19	G19	L19	R19
28/03/2012	92,57		G20	L20	R20

Tableau 9. Prélèvements de bourgeons floraux pour les analyses d'expression

En gris, les prélèvements réalisés après la levée d'endodormance (trait rouge). Les dates en gras représentent les prélèvements utilisés dans l'analyse par qPCR.

La variété espagnole 'Cristobalina' est choisie comme témoin pour les études d'expression. En effet, il s'agit d'une variété très intéressante pour ses très faibles besoins en froid (30.4 portions de froid), expliquant sa très grande précocité, 20 à 21 jours avant 'Burlat' (Alburquerque *et al.*, 2008).

I.2. Matériel végétal étudié.

- Pour la cartographie :

L'équivalent d'environ un gramme de jeunes feuilles est prélevé sur tous les individus, parents et descendants, et immédiatement congelé dans l'azote liquide. Au laboratoire, les feuilles seront finement broyées dans l'azote liquide puis la poudre sera stockée à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

- Pour l'évaluation des besoins en froid :

Trois rameaux âgés de trois ans sont récoltés sur chaque individu, de manière aléatoire dans l'arbre, toutes les semaines du 1^{er} novembre jusqu'à la levée de l'endodormance. Ces rameaux doivent au moins comprendre 30 bourgeons qui seront nécessaires aux observations. Les rameaux sont placés dans de l'eau, le temps de l'expérimentation.

- Pour l'étude d'expression :

A chaque prélèvement (**Tableau 9**), une vingtaine de rameaux de 3 ans sont récoltés pour les variétés 'Cristobalina', 'Garnet', 'Lapins' et 'Regina'. Trois grammes de bourgeons floraux, présents sur les bouquets de mai, sont prélevés sur chaque individu toutes les 5 portions de froid, d'octobre à mars. Après avoir écaillé les bourgeons à l'aide d'un scalpel, ils sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Les 3 g de bourgeons floraux seront répartis en 3 aliquotes d'un gramme, finement broyés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour l'extraction d'ARN.

II. Caractères étudiés

II.1. Besoins en froid

Les besoins en froid sont calculés sur la période allant du 1^{er} novembre jusqu'à la levée de l'endodormance ou levée de dormance (satisfaction des besoins en froid) au cours de trois années d'étude (2009/2010, 2010/2011, 2011/2012). La température dans le verger est enregistrée toutes les heures afin d'estimer l'accumulation de froid. L'estimation de la levée de dormance est réalisée suivant un protocole de forçage utilisé sur les arbres fruitiers (Campoy *et al.*, 2011a; Castède *et al.*, 2014). Pour chaque individu, les trois rameaux récoltés sont placés dans de l'eau en forçage dans une chambre de culture (25°C, lumière blanche, photopériode : 16h de jour/ 8h de nuit). Après sept jours, le stade phénologique des 30

bourgeons est observé et noté. On considèrera qu'il y a levée de dormance quand environ 30% des bourgeons seront en stade pointe verte, soit le stade B-C selon la nomenclature de Baggiolini (1952) (**Figure 24**) ou stade de croissance phénologique 53 selon l'échelle internationale BBCH (**Annexe 2**) (Meier *et al.*, 1994). Les besoins en froid (Chill requirement, CR) seront alors calculés toutes les heures suivant le modèle dynamique (Fishman *et al.*, 1987).

Ce modèle repose sur l'hypothèse que l'accumulation de froid, sous forme de portions de froid, suit un modèle qui se déroule en deux étapes, comme le montre la formule suivante:

$$Pr\acute{e}curseur \underset{\underset{k_{1}}{\leftarrow}}{\overset{k_{0}}{\rightarrow}} Compos\acute{e} \ interm\acute{e}diare \overset{k_{2}}{\rightarrow} Compos\acute{e} \ final$$

Lors de la première étape réversible, un composé intermédiaire est formé. Si les températures restent relativement basses, ce composé intermédiaire peut dans une deuxième réaction irréversible, former un composé final qui s'accumule dans le bourgeon, alors que si les températures sont élevées, une réaction antagoniste se déroule annulant l'effet initial du froid (Fishman *et al.*, 1987).

Le calcul des portions de froid (Chill portions, CP) est complexe et suit les équations suivantes :

$$\begin{aligned} x_{i} &= \frac{e^{slp \cdot tetmlt \cdot ((T_{K} - tetmlt)/T_{K})}}{1 + e^{slp \cdot tetmlt \cdot ((T_{K} - tetmlt)/T_{K})}} \\ x_{s} &= \frac{a_{0}}{a_{1}} \cdot e^{(e_{1} - e_{0})/T_{K}} \\ ak_{1} &= a_{1} \cdot e^{-(e_{1}/T_{K})} \\ inter_{E} &= x_{s} - (x_{s} - inter_{s}) \cdot e^{-ak_{1}} \\ inter_{s} &= \begin{cases} t = t_{0} &: 0 \\ t > t_{0} \wedge inter_{E_{t-1}} < 1 : inter_{E_{t-1}} \\ t > t_{0} \wedge inter_{E_{t-1}} \ge 1 : inter_{E_{t-1}} \cdot (1 - x_{i}) \end{cases} \\ delt &= \begin{cases} t = t_{0} &: 0 \\ t > t_{0} \wedge inter_{E_{t-1}} \ge 1 : inter_{E_{t-1}} \cdot (1 - x_{i}) \\ t > t_{0} \wedge inter_{E_{t-1}} \ge 1 : x_{i} \cdot inter_{E_{t-1}} \end{cases} \\ CP_{t} &= \begin{cases} t = t_{0} : delt \\ t \ge t_{0} : delt + CP_{t-1} \end{cases} \end{aligned}$$

Où slp, tetmlt, a_0 , a_1 , e_0 et e_1 sont les constantes du modèle ici 1.60, 277, 1.40×10^5 , 2.57×10^{18} , 4.15×10^3 et 1.29×10^4 , respectivement ; T_k est la température horaire en kelvin ($T_K = T_{\circ C}+273$) ; t exprime le temps en heure et t_0 marque le début de l'accumulation de froid.

II.2. Besoins en chaleur

Les besoins en chaud sont évalués sur trois ans (2010-2012), de la levée de dormance à la floraison, selon le modèle proposé par (Richardson *et al.*, 1974). L'accumulation de chaleur est estimée en degré de croissance par heure (GDH, Growing Degree Hours). Spécifique à chaque génotype, les besoins en chaud (Heat requirement, HR) correspondent à la somme des « actions chaudes » journalières (T_R) entre la levée de dormance (LD) et la floraison (Flo), selon l'équation suivante :

$$\operatorname{HR}(\operatorname{GDH}) = \sum_{i=LD}^{Flo} T_R \quad \operatorname{avec} \quad \stackrel{\bullet}{=} \begin{array}{l} si \ 4.5^{\circ} \mathrm{C} \leq T_{horaire} \leq 25^{\circ} \mathrm{C}, \quad T_R = T_{horaire} - 4.5 \\ \bullet \ si \ T_{horaire} \geq 25^{\circ} \mathrm{C}, \quad T_R = 21.5 \end{array}$$

A des températures inférieures à 4,5°C, aucune croissance ou développement d'embryons n'est possible. Au-dessus de 25°C, température plafond, l'arbre ne retire plus aucun bénéfice de chaleur supplémentaire (Anderson & Richardson, 1986).

II.3. Date de floraison

Tout au long de la période de floraison, les dates de floraison sont notées individuellement au verger à raison de deux à trois fois par semaine. Un observateur unique note la date de pleine floraison qui correspond à la date à laquelle 70% des bourgeons floraux ont atteint le stade 'fleur épanouie'. Les dates de floraison sont notées en jours calendaires avant d'être transformées en jours Julian à partir du 1^{er} janvier. La descendance de cartographie R×L a été observée sur huit ans (2006, 2008-2014) et R×G sur sept ans (2008-2014). D'autres observations relatives à la phénologie de la floraison sont également réalisées : la date de début de floraison c'est-à-dire la date à laquelle 10% des bourgeons floraux ont atteint le stade 'fleur épanouie', la date de mi-floraison c'est-à-dire la date à laquelle 50% des bourgeons floraux ont atteint le stade 'fleur épanouie' et la date de fin floraison quand 80% des fleurs sont fanées.

III. Analyses moléculaires

III.1. Extraction d'ADN

Pour chaque individu, parents et descendances, l'extraction d'ADN est réalisée, en microtube, à partir de 1 g de feuilles finement broyées en utilisant le kit 'DNeasy Plant Maxi Kit' (Qiagen) et en suivant le protocole préconisé par le fournisseur. La qualité des ADN extraits est visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%. La quantité des ADN est estimée par dosage spectrophotométrique (Nanodrop®3300, Thermo scientific). Les solutions mères d'ADN sont stockées à -20°C. Un aliquot est prélevé et dilué pour être utilisé à une concentration de 5 ng/µl.

III.2. Extraction d'ARN totaux

L'extraction d'ARN totaux à partir de tissus végétaux ligneux est rendue délicate par la grande teneur en composés phénoliques et/ou polysaccharides.

Le protocole expérimental mis au point par Tong *et al.* (2012) a été amélioré au sein du laboratoire afin de minimiser l'utilisation de produits toxiques (β -mercaptoethanol et trissaturated phenol pH 7.8) (Wenden B., 2014). Ce protocole permet d'éliminer la plupart des polyphénols par utilisation de polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP). Le complexe PVPP-phénol est éliminé avec les débris cellulaires et autres métabolites lors du nettoyage au chloroforme.

Le broyat de bourgeons floraux est repris dans le tampon d'extraction chaud (CTAB 2,5%, PVPP 2%, EDTA 0,025 M, NaCl 2 M, Tris-HCl 0,1 M pH=8, β -mercaptoethanol 2%), homogénéisé et mis à incuber 30 min à 65°C. Après centrifugation la phase aqueuse est extraite au chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Les acides nucléiques sont précipités au moins 30 min à -20°C par 400 µl d'isopropanol froid. Le culot obtenu est resuspendu dans un tampon TE (EDTA 0,001 M, Tris-HCl 0,01 M pH=8). Les ARN sont précipités par le chlorure de lithium (LiCl) 10 M une nuit à 4°C. Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché à l'air libre et resuspendu dans 20 à 30 µl d'eau sans nucléases (Qiagen).

Après une nuit à -20°C pour permettre une dissolution complète, une étape de purification sur colonne utilisant la DNase I est réalisée avec le kit 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen) en suivant le protocole préconisé par le fournisseur.

Les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrique (Nanodrop®3300, Thermo scientific). La pureté des échantillons est estimée par le rapport des densités optiques mesurées à 260 nm et à 280 nm pour la contamination protéique et des densités optiques mesurées à 260 nm et à 230 nm pour la contamination par les polyphénols et polysaccharides. La qualité des ARN totaux extraits est visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%. Les solutions mères des ARN totaux sont stockées à -80°C. Un aliquot est prélevé et dilué pour être utilisé à une concentration de 200 ng/µl.
III.3. Définition des amorces

Le génome du cerisier n'étant pas disponible au cours de ma thèse, les séquences des gènes candidats ont été recherchées dans un premier temps, parmi les séquences déposées chez d'autres espèces telles qu'Arabidopsis, le pêcher, le peuplier, à partir des bases de données disponibles: NCBI (National Center for Biotechnology publiques Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), TAIR (The Arabidopsis Information Resource, http://arabidopsis.org/) et GDR (Genome Database for Rosaceae, http://www.rosaceae.org/). Dans un deuxième temps, les séquences des gènes candidats chez le cerisier sont recherchées sur la base de données issue du transcriptome du cerisier réalisé à partir de la variété 'Regina' à l'aide d'algorithmes de type nucléotide BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool). Les séquences de cerisier, identifiées par homologie de séquences avec les gènes candidats identifiés sur d'autres espèces, sont alors utilisées pour définir les amorces.

Les amorces utilisées pour le séquençage sont définies à l'aide du logiciel Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/) (Untergasser *et al.*, 2007) suivant les paramètres donnés : une température d'hybridation (Tm) des amorces d'environ 60°C, une haute stringence contre la formation de dimères d'amorces, un pourcentage de GC autour de 50%, une taille des amorces de 20 pb et un produit d'amplification entre 200 et 1000 pb.

Pour l'étude d'expression, les amorces doivent présenter les paramètres suivants : Tm des amorces entre 60°C et 63°C, la différence de Tm des deux amorces ne doit pas excéder 10°C, une haute stringence contre la formation de dimères d'amorces, pas d'appariement en 3' entre amorces, un pourcentage de GC entre 50% et 60%, une taille des amorces de 16 à 24 pb, les amorces doivent si possible chevaucher ou encadrer un intron et un produit d'amplification entre 60 et 200 pb.

La spécificité des amorces est ensuite vérifiée par BLAST. Les amorces ont toutes été synthétisées par la société Sigma.

III.4. Séquençage de l'ADN

En utilisant les couples d'amorces précédemment définies, spécifiques d'un gène candidat, le fragment de la séquence située entre les amorces est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne du fragment (Polymerase Chain Reaction ou PCR) pour identifier un polymorphisme de séquence.

L'amplification par PCR est réalisée, selon le protocole suggéré par le fournisseur (VWR), dans un volume final de 12 μ l, 1 μ l d'ADN à 5 ng/ μ l est ajouté au mélange réactionnel : tampon PCR '10X Key Buffer' 1X, dNTP 0,2 mM de chaque amorce, sens et anti-sens, 0,4 μ M de chaque, Taq polymérase (VWR) à 0,05 U/ μ l. Le programme PCR débute par une dénaturation de 5 min à 94°C, puis 35 cycles successifs de trois étapes ont lieu : dénaturation de l'ADN pendant 45 secondes à 94°C, hybridation des amorces sur la matrice pendant 45 secondes à une température spécifique aux amorces (de 55° à 60°C), élongation de l'ADN par la Taq polymérase pendant 2 min à 72°C. L'amplification se termine par une phase d'extension finale de 4 min à 72°C.

La vérification de la qualité de l'amplification par PCR et l'estimation de la taille des fragments amplifiés à l'aide de marqueurs de taille sont réalisées à partir d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. La quantification est estimée visuellement par l'utilisation d'une gamme de dilution de phage lambda (20, 30, 60, 90 ng/µl). Les solutions mères des ADN génomiques sont stockées au -20°C. Un aliquot est prélevé et dilué pour être utilisé à une concentration de 5 ng/µl.

Le séquençage est réalisé par la société Beckman Coulter Genomics selon la technique de séquençage Sanger. Les produits d'amplification de PCR sont alors envoyés selon les recommandations de préparations des échantillons indiquées sur le portail web Cogenics Online

(https://www.cogenicsonline.com/COL/uwa.maya.engine.MayaEngine?siteid=col&mapid=co nnect&startnodeid=connection).

III.5. Étude d'expression en qPCR

L'étude de l'expression d'un sous ensemble de gènes candidats au cours de la dormance est réalisée par réaction de PCR quantitative (ou en temps réel, qPCR). Cette qPCR est précédée d'une étape de transcription inverse (reverse transcription, RT) à partir de nos échantillons d'ARN_{totaux} afin d'obtenir des ADNc qui serviront de matrice. Cette étude a été réalisée au sein de la Plateforme Génome Transcriptome (PGTB) du centre de génomique fonctionnelle de Bordeaux (<u>http://www.pgtb.u-bordeaux2.fr/La-plateforme</u>) à Cestas-Pierroton.

III.5.1. Réaction de transcription inverse

L'étape de transcription inverse permet la synthèse d'ADNc stables à partir d'amorces spécifiques, en utilisant l'ARN comme matrice. Pour cette étape, le kit « iScript[™] cDNA Synthesis Kit » (Bio-Rad) est utilisé en suivant le protocole suggéré par le fabricant.



Figure 42. Cycle PCR en présence de SYBR® Green.

① Durant la dénaturation, le SYBR Green est libre et peu de fluorescence. ② À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN. ③ Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au double brin. A la fin d'un cycle, l'excitation des fluorochromes (éclair0) permet l'émission de la fluorescence suivie en temps réel.

Dans un volume final de 20 μ l, 1 μ g d'ARN_{totaux} extrait est ajouté au milieu réactionnel : 4 μ l de mix « 5x iScriptTM Reaction Mix », 1 μ l de iScriptTM reverse transcriptase. Le mélange est placé à incuber à l'aide d'un thermocycleur en suivant le programme : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C puis 5 min à 85°C.

Une amplification par PCR est effectuée pour vérifier la qualité des ADNc. Les produits d'amplification sont observés à partir d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Les solutions mères des ADNc sont diluées au cinquantième, conditionnées en plaques de 96 puis stockées à -80°C.

III.5.2. PCR quantitative

Dans un thermocycleur équipé d'un détecteur fluorimètrique numérique, l'amplification PCR est réalisée en présence de SYBR[®] Green, un intercalant fluorescent de l'ADN. Au cours de phase d'élongation ce colorant s'accumule au niveau des doubles brins d'ADN. En se liant à l'amplicon, il subit un changement de conformation et émet une fluorescence intense (longueur d'onde d'excitation maximum 497 nm, longueur d'onde d'émission maximum 520 nm) (**Figure 42**).

Cette fluorescence émise est assimilée à l'accumulation d'ADN double brin dans le milieu réactionnel à chaque cycle de PCR. L'enregistrement en temps réel de la fluorescence émise permet la visualisation d'une phase exponentielle, pendant laquelle le signal est proportionnel à la quantité d'ADN présente initialement. L'intégration, par le programme LightCycler® 480 version 1.5.0.39 (Roche Diagnostics), du signal fluorescent émis restitue le nombre de cycles nécessaires (noté Cp pour Crossing point) pour que le signal mesuré soit égal à un certain seuil. Ici, la valeur seuil est fixée à 200 pour tous les gènes.

Les expériences ont été réalisées avec le kit « LightCycler® 480 PCR Master SYBR Green » (Roche) en suivant le protocole suggéré par le fabricant.

Dans un volume final de 10 µl, 3 µl d'ADNc dilué au cinquantième sont ajoutés au milieu réactionnel contenant 5 µl de pré-mix « LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master » (Roche) et 0,5 µl de chaque oligonucléotide à 10 µM. Les amplifications sont réalisées dans des plaques 384 puits dans le thermocycleur LightCycler® 480 instrument II (Applied biosystems). Un programme classique de PCR en trois étapes est suivi. Il comprend une étape initiale de dénaturation de 10 min à 95°C, suivie d'une série de 45 cycles comprenant une étape de dénaturation de 20 s à 95°C, une étape d'hybridation des amorces de 20 s à 57°C et une étape d'élongation de 20 s à 72°C. Enfin, au cours d'une dernière étape, chaque produit PCR formé est soumis à une augmentation graduelle de température de 57 à 95°C par pas de 95

0,5°C toutes les 10 s, ce qui permet d'établir une courbe de fusion pour chaque réaction. Les courbes de fusion permettent de déterminer, pour chaque produit de PCR formé, sa température de dissociation et ainsi de vérifier la synthèse d'un seul produit de PCR par réaction et donc la spécificité des amorces utilisées.

Une gamme étalon de cinq points de dilutions (1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100) est réalisée à partir d'un mélange d'ADNc à analyser non dilués. L'analyse de cette gamme permet de calculer l'efficacité de la PCR, qui est déterminée suivant la méthode « 2nd derivative max method » du programme LightCycler® 480 version 1.5.0.39 (Roche Diagnostics). Une efficacité idéale est comprise entre 95 et 105%. Avec une efficacité de 100%, le nombre de copies est doublé à chaque cycle d'amplification.

III.5.3. Normalisation des niveaux d'expression

Pour chaque échantillon, deux réplicats biologiques et trois répétitions techniques sont analysés. Les résultats sont traités et normalisés. Pour chaque réplicat, les résultats bruts sont les moyennes des valeurs de Cp de chaque répétition (Cpmoy) et leurs déviations standards (sd). Dans chaque condition expérimentale, la quantité relative de transcrits de chaque réplicat (ratio) est déterminée selon la méthode décrite par Pfaffl (2001), dont l'équation est présentée ci-dessous :

$$ratio = \frac{(E_{cible})^{\Delta Cp_{cible}(contrôle-échantillon)}}{(E_{référence})^{\Delta Cp_{référence}(contrôle-échantillon)}}$$

où E_{cible} est l'efficacité d'amplification du gène cible (déterminée par les gammes étalons) ; $E_{référence}$ est l'efficacité de l'amplification du gène de référence (déterminée par les gammes étalons) ; ΔCp_{cible} est la différence entre le Cpmoy de l'échantillon contrôle et le Cpmoy de l'échantillon analysé pour le gène cible ; $\Delta Cp_{référence}$ est la différence entre le Cpmoy de l'échantillon contrôle et le Cpmoy de l'échantillon analysé pour le gène référence.

L'échantillon contrôle est généralement l'échantillon de plus faible niveau de l'expérience. L'*ACTIN (ACT)* et la *RNA POLYMERASE II (RPII)* sont utilisées comme gènes de référence.

Pour chaque échantillon, la moyenne des ratios des deux réplicats biologiques (RATIO) et leur déviation standard (SD) sont calculées. Chaque point de la cinétique correspond au RATIO de chaque échantillon. L'erreur standard pour chaque point (SE) est calculée grâce à la formule :

 $SE = SD / \sqrt{n}$ avec n, le nombre de réplicats biologiques étudiés.



Figure 43. Analyse de l'expression du gène de référence ACT.

Les courbes sont presque toutes confondues sauf une répétition technique (échantillon 1 en violet, 2 en vert et 3 en rouge). De plus on observe une seule courbe de fusion qui nous indique qu'un seul produit de PCR a été amplifié.

III.5.4. Optimisation du protocole de qPCR.

III.5.4.1. Choix des échantillons à analyser

Pour décrire la variabilité des gènes candidats au cours de la dormance, des prélèvements de bourgeons floraux ont été récoltés de la mi-octobre à la floraison. Pour chacune des 4 variétés de cerisier étudiées, trois prélèvements de bourgeons ont été effectués toutes les 5 portions de froid (**Tableau 9**). L'ARN total a été extrait pour chacun de ces 225 prélèvements. Au cours de ma thèse, seuls les échantillons prélevés toutes les 10 portions de froid ont été étudiés en qPCR (**Tableau 9**).

Parmi les 225 prélèvements, une vingtaine d'échantillons présentant les concentrations d'ARN les plus importantes ont été sélectionnés pour effectuer les tests préliminaires à l'analyse ainsi que pour réaliser le pool d'ADNc utilisé pour la gamme étalon. Ces échantillons ont été choisis de façon aléatoire entre les différentes dates de prélèvement et les différentes variétés étudiées.

III.5.4.2. Choix des gènes de références

Afin de normaliser les résultats de qPCR, cinq gènes de référence ont été sélectionnés : les gènes ACTIN (ACT), ELONGATION FACTOR 1 (EF1), RNA POLYMERASE II (RPII), TRANSLATION ELONGATION FACTOR 2 (TEF2) et UBIQUITINE (UBQ). ACT, EF1 et UBQ sont classiquement utilisés comme gènes de référence pour ces études. RPII et TEF2 sont généralement utilisés chez le pêcher [Tong et al, 2009]. Seuls deux gènes seront choisis comme gènes de référence pour cette étude.

Ces gènes sont testés dans un premier temps sur trois échantillons distincts : l'échantillon 1 correspond au début de la dormance pour la variété 'Cristobalina', l'échantillon 2 correspond au début de dormance pour le parent 'Regina', l'échantillon 3 correspond à la phase d'écodormance pour 'Regina'. Seuls les couples d'amorces présentant une grande stabilité entre les échantillons (Cp significativement identique) ont été retenus comme gènes de référence (**Figure 43**).

Suite à ces analyses, ACT et RPII ont été choisis comme gènes de référence et ont été testés sur la gamme étalon.





Exemple d'un marqueur hétérozygote chez un parent (AB) et homozygote (BB) chez l'autre (points verts).

IV. Analyses génétiques

IV.1. Analyses statistiques

Les valeurs moyennes, maximales et minimales pour chaque caractère ont été calculées pour les différentes années d'évaluation. La normalité du caractère est vérifiée par le test de Shapiro (shapiro.test) et la corrélation entre deux variables a été calculée selon la méthode de Spearman (cor.test(..., method="spearman")) sur le logiciel R 2.15.0 (R Development_Core_Team, 2012). L'égalité des variances est vérifiée en utilisant le test de Bartlett (bartlett.test). Selon des méthodes proposées par Dirlewanger et al. (2012), l'héritabilité des caractères (broad-sense heritability, H_{BS}) est estimée en considérant les mesures de chaque année comme répétition. Une analyse de variance sur la base du modèle linéaire aléatoire est réalisée pour estimer l'héritabilité du caractère:

$$\mathbf{Y}_{ij} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{y}_i + \mathbf{g}_j + \mathbf{e}_{ij}$$

Avec Y_{ij} la valeur phénotypique du génotype j au cours de l'année i; μ la valeur moyenne du caractère; y_i l'effet de l'année i sur le caractère; g_j l'effet du génotype j; et e_{ij} l'interaction génotype \times année, ici considérée comme l'erreur résiduelle. La normalité des résidus a été testée sur R.

H_{BS} a été estimée à l'aide des équations suivantes:

$$H_{BS} = \frac{s_g^2}{s_g^2 + \frac{s^2}{n}}$$

Avec $S_g^2 = (MS_g - MS_{residual}) n^{-1}$, la variance génétique ; MS_g , le carré de la moyenne estimé par génotype ; $MS_{residual}$, le carré de la moyenne estimé pour l'erreur résiduelle ; s², la mesure de la variabilité due à l'interaction génotype × année ; et n, le nombre d'années de l'expérience.

IV.2. Réalisation de cartes génétiques

IV.2.1. Génotypage

Les deux familles étudiées et leurs parents respectifs ont été génotypés en utilisant la puce RosBREED cherry 6K SNP v1 (Peace *et al.*, 2012). Les marqueurs de la puce RosBREED cherry 6K SNP v1 ont été déposés dans la base de données SNP disponible sur le site du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP). Les puces à ADN ont été scannées et les résultats obtenus ont été analysés en utilisant le logiciel GenomeStudio (**Figure 44**). La



Figure 45 Séquences visualisées avec BioEdit

Un polymorphisme SNP est indiqué par une flèche. Un parent est homozygote [T/T] (en haut) et l'autre est hétérozygote [T/C] (Y en bas).

position de ces marqueurs sur la carte physique du génome v1.0 pêche (Verde *et al.*, 2013), ainsi que leurs positions sur les cartes génétiques G, L, R, R \times G et R \times L sont disponibles dans le **Tableau Publication 1-Table S2** (chapitre III. I.2.).

IV.2.2. Construction de la carte génétique

Les cartes de liaisons génétiques sont construites en utilisant le logiciel JoinMap®4.0 (van Ooijen, 2006). Les distances génétiques sont calculées avec la fonction de Haldane. La valeur seuil de LOD pour la construction d'un groupe de liaison est fixée 4, avec une fréquence de recombinaison maximum de 0,6. Les marqueurs sont encodés de la manière suivante :

Loci parentaux	Ségrégation	Génotypes possibles
Parents Hétérozygotes, 4 allèles	<ab×cd></ab×cd>	ac, ad, bc, bd,
Parents Hétérozygotes, 3 allèles	<ef×eg></ef×eg>	ee, ef, eg, fg,
Parents Hétérozygotes, 2 allèles	<hk×hk></hk×hk>	hh, hk, kk, h-, k-,
Parent 1 Hétérozygote	<lm×ll></lm×ll>	II, Im,
Parent 2 Hétérozygote	<nn×np></nn×np>	nn, np,

- : donnée manquante

L'adéquation de la ségrégation observée pour chaque marqueur avec les ségrégations attendues est évaluée par un test de χ^2 . Ce test repose sur l'hypothèse que les fréquences alléliques observées sont les mêmes que les fréquences théoriquement attendues. Les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation sont identifiés avec un risque d'erreur $\alpha = 5\%$ et écartés de la construction.

IV.3. Cartographie des gènes candidats

IV.3.1. Détection du polymorphisme

Suite au séquençage réalisé par la société Beckman Coulter Genomics, les résultats sont envoyés sous forme d'une succession de pics des quatre couleurs représentant l'alternance des nucléotides au sein de la séquence (**Figure 45**). Les séquences obtenues pour chaque gène candidat sont comparées aux séquences d'ADNc de l'unigène Regina, par BLASTn, afin de vérifier que les fragments amplifiés correspondent bien au gène candidat étudié. Les SNP sont alors détectés visuellement à partir des séquences de deux parents. Les SNP recherchés sont ceux qui sont homozygotes chez un parent et hétérozygotes chez l'autre avec une superposition de deux pics (**Figure 45**). Ce type de SNP est cartographié chez le parent hétérozygote.

IV.3.2. Génotypage et cartographie

Pour génotyper les gènes candidats dans les deux familles, la méthode de génotypage iPLEX Gold de SEQUENOM (http: // www.sequenom.com/Home) a été appliquée. Il s'agit d'une méthode de génotypage à haut débit basée sur l'extension d'amorces positionnées en 5' du



Figure 46. Principe de la méthode de génotypage Sequenom iPLEX Gold par extension d'amorces et spectrométrie de masse.

polymorphisme à génotyper (Figure 46). Cinquante nucléotides de part et d'autre du SNP, sans aucun autre SNP dans cette région sont nécessaires pour la définition d'un couple d'amorces.

Pour chaque SNP, un couple d'amorces est conçu permettant l'amplification d'une région d'une centaine de paires de bases contenant le polymorphisme d'intérêt. Une autre amorce dite d'extension est conçue de façon à se positionner à un nucléotide en amont du polymorphisme. Elle permet de réaliser l'extension d'une base qui sera différente en fonction de l'allèle étudié. Les fragments d'ADN obtenus, suite à cette extension d'une base, sont séparés en fonction de leur masse dans un spectromètre de masse MALDI-TOF. Les profils de spectre obtenus permettront le génotypage des individus pour les polymorphismes étudiés.

Le génotypage d'une quarantaine de SNP peut être réalisé simultanément sur les mêmes individus. Pour le multiplexage, les SNP sont sélectionnés de manière à limiter les interactions entre amorces.

Le génotypage a été réalisé via le système « MassARRAY® Analyzer 4 » (Sequenom, San Diego, USA) à la plateforme génome et transcriptome du centre de génomique fonctionnelle de Bordeaux à Pierroton. Les données sont analysées par le logiciel MassARRAY® Typer4 (Sequenom, San Diego, USA).

Les gènes candidats sont cartographiés sur les cartes génétiques parentales précédemment construites en intégrant ces données à celles des cartes *via* le logiciel JoinMap® 4.0.

IV.4. Détection de QTL

A partir d'une carte génétique, la détection d'un QTL consiste à calculer si la probabilité de corrélation entre la valeur d'une variable quantitative et les marqueurs positionnés sur la carte génétique est significative.

Pour la détection de QTL, la méthode dite de "multi-interval mapping" (Jansen & Stam 1994) a été choisie. Avec cette méthode, les QTL déjà détectés sont utilisés comme co-variables ou co-facteurs afin de s'affranchir du bruit de fond produit par les autres QTL et pour augmenter la puissance de détection de QTL sur les groupes de liaisons. De plus, elle permet de tester la présence d'un ou deux QTL sur chacun des groupes de liaison, par test de permutation (Churchill & Doerge 1994).

Les détections de QTL ont été réalisées en utilisant le logiciel MultiQTL V2.6 (Haifa, Israel, 2005; <u>http://www.multiQTL.com</u>).

Un LOD score (logarithm of the odds ratio), correspondant au logarithme décimal des rapports de maxima de vraisemblance entre les hypothèses de présence et d'absence d'un QTL, est calculé pour chaque intervalle. On note la présence d'un QTL quand le LOD score dépasse une valeur critique choisie de LOD de 3, ce qui signifie que, dans l'intervalle donné, on a au moins mille fois plus de chance d'avoir un QTL que de ne pas en avoir.

Deux analyses QTL sont réalisées.

- la première est effectuée sur les 122 individus de la famille de cartographie R × L en utilisant les cartes génétiques parentales 'Régina' et 'Lapins' regroupant 136 et 127 marqueurs sur 8 groupes de liaison, respectivement.
- La seconde a été réalisée sur les 117 individus de la famille de cartographie R × G en utilisant les cartes génétiques parentales 'Régina' et 'Garnet' regroupant 142 et 137 marqueurs sur 8 groupes de liaison, respectivement.

Pour chaque analyse, deux types de détection de QTL sont réalisés.

- Une détection de QTL année par année afin d'observer la stabilité du QTL entre années.
- Une détection de QTL en analysant simultanément les données des différentes années (Jansen et al. ,1995) pour augmenter la puissance de détection.

Pour chaque QTL détecté, un test de permutation (1000 permutations) est réalisé pour déterminer une probabilité d'existence (p). Au niveau chromosomique, l'existence du QTL est rejetée si $p > \alpha_{chr}$. α_{chr} correspond au risque d'erreur de type I au niveau chromosomique et est calculé selon l'équation suivante (Saintagne *et al.*, 2004) :

$$\alpha_{chr} = 1 - (1 - [1 - (1 - \alpha_g)^{1/M}])^m$$

Avec *M*, le nombre total de marqueurs sur la carte génétique parentale utilisée; *m*, le nombre de marqueurs dans le groupe de liaison. Le risque d'erreur de type I au niveau génomique (α_g) est fixé à 5%.

Le pourcentage de variation phénotypique expliquée par le QTL est calculé selon :

$$EV = \frac{1}{4} \left(\frac{d^2}{\alpha_{ph}^2} \right)$$

Avec d^2 , l'effet estimé du QTL (d=X(A)-X(B), X(A) et X(B) sont les effets des deux génotypes homozygotes A et B, respectivement); α_{ph} , la variabilité phénotypique du caractère.

Résultats

Chapitre III. Résultats

Cette section sera divisée en deux parties : la première comprendra les résultats concernant le déterminisme génétique de la floraison qui sera présentée sous forme de publication (Erreur ! ource du renvoi introuvable.), la seconde comprendra les résultats portant sur le déterminisme moléculaire de la floraison. Pour cette seconde partie, la publication référente (**Publication 2**) sera envoyée à la soumission de BMC Plant Biology.

I. Déterminisme génétique de la floraison.

I.1. Introduction

Dans un contexte de changements climatiques préoccupants, la date de floraison est l'un des caractères principaux qui permettraient l'adaptation du cerisier aux futures conditions climatiques. La connaissance du déterminisme génétique de ce caractère complexe, ainsi que de ses composantes : les besoins en froid et les besoins en chaud, permettront à terme, d'augmenter l'efficacité des programmes de sélection axés sur l'adaptation aux conditions climatiques et, ainsi, de mieux gérer les impacts du climat sur la production du cerisier. Cette étude repose essentiellement sur une approche QTL.

L'analyse des besoins en froid, des besoins en chaud, et de la date de floraison dans les descendances R×G et R×L a permis l'identification des QTL pour ces caractères. Ces résultats sont présentés dans la publication suivante (Author's Pre-print version) :

Castède S, Campoy JA, García JQ, Le Dantec L, Lafargue M, Barreneche T, Wenden B, Dirlewanger E. 2014. Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytologist* 202(2): 703-715.

I.2. Publication 1

Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements

Sophie Castède^{1,2}*, José Antonio Campoy^{1,2}*, José Quero-García^{1,2}, Loïck Le Dantec^{1,2}, Maria Lafargue³, Teresa Barreneche^{1,2}, Bénédicte Wenden^{1,2}, Elisabeth Dirlewanger^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France ²INRA, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France ³INRA, UMR 1287 Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Author for correspondence: Dirlewanger Elisabeth Tel: 33 5 57 12 24 61 Email: <u>dirlewan@bordeaux.inra.fr</u>

Received: 23 October 2013 Accepted: 25 November 2013 Article first published online: 13 JAN 2014 New Phytologist (2014) 202:703–715 DOI: 10.1111/nph.12658

*These authors contributed equally to this work.

Summary

- The present study investigates the genetic determinism of flowering date (FD), dissected into chilling (CR) and heat (HR) requirements. Genetic determinism of flowering traits is crucial to anticipate the increasing adaptation problems due to global climatic change in most temperate-fruit species.
- CR and HR were evaluated over three years and FD over five years in an intraspecific sweet cherry F₁ progeny, in addition to FD over six years in a different F1 progeny.
- High heritability was obtained for CR and FD contrarily to HR. One QTL with major effect and high stability between years of evaluation was detected for CR and FD on the same region of linkage group (LG) 4. For HR no stable QTL was detected. Candidate genes underlying the major QTL on LG4 were investigated and key genes were identified for CR and FD.
- Phenotypic dissection of FD and year-repetitions let us identify CR as the high heritable component of FD. QTLs for CR reported in this study are the first described in this species. Our results provide the first basis for the identification of genes involved in CR and FD in sweet cherry that could be used to develop ideotypes adapted to future climatic conditions.

Keywords: chilling requirement, climate change, dormancy, flowering date, heat requirement, phenology, *Prunus avium*, quantitative trait loci

Introduction

Climate change is considered as one of the main environmental problems of the 21st century. According to the IPCC fourth assessment report, global average surface temperature has increased by 0.74±0.18°C in the last century and an increase by another 1.1-6.0°C is projected to this century (IPCC, 2007). This increase may put at risk fruit tree production in the coming decades in different temperate and subtropical regions throughout the world (Hanninen & Tanino, 2011; Luedeling, 2012). This risk is associated to the lack of adaptation of the dormancy/growth cycle to future climatic conditions mainly related to a higher frequency of spring frost and insufficient chilling requirement fulfillment events (Campoy et al., 2011a). In plants, the dormancy/growth cycle is synchronized to environmental and climatic conditions. Temperate tree species have developed a strategy to adapt to alternating well-differentiated seasons based on bud dormancy that helps to protect bud from winter cold, ensuring that flowering occurs under optimal conditions. Lang (1987) proposed a physiological classification scheme for the different dormancy states considering inputs and origins of dormancy-imposing cues. Ecodormancy corresponds to the growth inhibition found in late winter and spring and it is imposed by unfavourable temperatures. Paradormancy is equivalent to correlative inhibition or apical dominance whereas deep dormancy defines endodormancy. In temperate fruit tree species, exposition to cold in winter (fulfillment of chilling requirement -CR- for overcoming endodormancy) followed by warm period (fulfillment of heat requirement –HR–) in spring is essential for flowering. Thus, phenological traits such as CR and HR play a key role in flowering date (FD) and are crucial for the synchronization of flowering time with the environmental conditions. Consequently, climate warming during winter and spring is responsible for several disruptions already manifested in temperate fruit trees (Hanninen & Tanino, 2011; Luedeling, 2012). Advances in bud break and blooming dates are reported for many species, increasing the risk of frost damage (Cannell & Smith, 1986). Frost damage, in the USA, causes more economic losses than any other weather-related phenomenon (White & Haas, 1975). Moreover, climate warming will induce an incomplete dormancy release in many temperate and subtropical regions (Luedeling, 2012) that could lead to bud burst delay, low bud burst rate and lack of uniformity of leafing and bloom, resulting in higher flower-bud drop and morphological abnormalities which could have important impacts on fruit production. This would be especially important in species with scarce low-chill commercial cultivars, such as sweet cherry or apricot.

Sweet cherry (*Prunus avium* L.), belonging to the *Prunus* genus within the *Rosaceae* family, is grown in temperate climate and enters into dormancy to persist through freezing

temperatures during autumn and winter. However, as in most woody perennials, including poplar (*Populus* ssp.), the most studied species for these traits, the dormancy and flowering control is not completely understood (Ruttink *et al.*, 2007; Cooke *et al.*, 2012). Some investigations have been directed towards the elucidation of the genetic control of flowering time. These studies have shown that CR has much stronger effects than HR on FD on most *Prunus* species: sweet cherry (Alburquerque *et al.*, 2008), apricot (*Prunus Americana* L.) (Campoy *et al.*, 2012), almond (*Prunus amygdalus* L. syn. *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) (Sanchez-Perez *et al.*, 2012), and peach (*Prunus persica L.*) (Okie & Blackburn, 2011).

FD is considered to be quantitatively inherited in most fruit tree species (Anderson & Seeley, 1993). Substantial progress has been made in identifying Quantitative Trait Loci (QTLs) for this trait in *Prunus*: almond (Silva *et al.*, 2005; Sanchez-Perez *et al.*, 2012), apricot (Campoy *et al.*, 2011b; Dirlewanger *et al.*, 2012), sour cherry (*Prunus cerasus* L.)(Wang *et al.*, 2000), sweet cherry (Dirlewanger *et al.*, 2012) and peach (Dirlewanger *et al.*, 2012). Recently, the dissection of FD into CR and HR has been reported in peach (Fan *et al.*, 2010) and in apricot (Olukolu *et al.*, 2009). The co-localization of FD and CR together with the low heritability of HR, suggest that FD might be more strongly associated with CR rather than HR. However, the interaction of the environmental conditions on the genetic control is still to be determined and requires time consuming phenotyping to dissect FD into CR and HR.

The main objective of this study was to dissect the genetic determinism of FD into CR and HR and to analyze their interaction with environmental conditions. To reach this objective, phenotyping was performed through highly-contrasted climatic conditions. This study aims to i) investigate the effect of environmental conditions on the genetic control of these traits, to ii) compare the genomic regions involved in FD in two different genetic backgrounds and to iii) identify CGs by *in silico* mapping using the peach genome sequence annotation. This work provides further information on the genetic basis of these traits and allows increasing the efficiency of breeding strategies focused on the adaptation to upcoming climatic conditions of a specific region.

Material and methods

Plant material

Two intraspecific F_1 progenies from a cross-pollination of heterozygous parents were analyzed (1) one derived from a cross between a German cultivar, 'Regina', and an American cultivar, 'Lapins', called R×L, consisting of 124 individuals. 'Lapins' was one of the first self-fertile commercialized cultivars; (2) the other F_1 progeny, called R×G, was issued from a cross between the cultivar 'Regina' and an American cultivar 'Garnet', and includes 117 individuals. 'Regina', 'Lapins' and 'Garnet' were used because they differ for various traits and especially FD. These progenies were cultivated in the fruit tree experimental field of INRA-Bordeaux research center in Toulenne, near Bordeaux in France. The mature progenies and parents were grown on deep loamy soil on the bank of Garonne River at 15 m above sea level, lat. 44.57N, long. 0.28W, in a mild winter region with a yearly average rainfall of 825 mm.

Phenotypic trait assessment

Phenotyping has been carried out on each parent and their progenies. CR were evaluated during three consecutive years (2010-2012) on the 117 individuals of the R×G progeny following a forcing protocol widely used in temperate fruit trees (Campoy et al., 2011a). Hourly temperatures were collected in the field from the 1st October until the FD using an automatic data-logger (Ebro®, Ingolstadt) in order to determine the chilling and heat accumulation in the experimental field conditions. Three one-year-old fruiting branches for each individual were randomly collected once a week from the 1st November until CR were achieved. At least a total of thirty buds were collected across the three branches for each sampling date. The base of the branches were placed in water in a growth chamber (25 °C, under white fluorescent tubes during a photoperiod, 16h : 8h, light : dark) to force floral bud break. After seven days, the phenological stage of the flower buds was observed. The date of dormancy release was established when 30% of flower buds were at the advanced Baggiolini's stage B-C or at the phenological growth stage 53 according to the international BBCH-scale (Meier et al., 1994; Alburguerque et al., 2008). The Dynamic model (Fishman et al., 1987) was then used to calculate the chilling accumulation as Chill Portion (CP) from the 1st October until the dormancy release, corresponding to the CR. Higher CP values mean more chilling is required to break dormancy. Among the different models used to calculate chilling accumulation (Campoy et al., 2011a), the Dynamic one was chosen on the basis of the better performance in different climatic conditions (Luedeling & Brown, 2011).

HRs were evaluated on 3 years (2010-2012) on the $R \times G$ progeny. The model proposed by Richardson *et al.* (1974) was used to calculate heat accumulation as growing degree hours (GDH) between the dormancy release and the FD.

FDs were evaluated during 6 years for R×L (2006, 2008-2012) and 5 years for R×G (2008-2012) when 70% of the floral buds reached the full bloom stage in the field. For each genotype, the whole tree of one clone was observed every one or two days during the flowering period. A single person evaluated the FD and recorded as number of days from January 1st of the year. Four years phenotyping data of the R×L family have already been used for QTL detection for flowering using an SSR marker-based map (Dirlewanger *et al.*, 2012).

Statistical analysis of phenotypic data

Mean, minimum and maximum values of traits were calculated for the different years of evaluation. Measure of between-year stability was considered as a broad-sense heritability (broad-sense heritability, H_{BS}) and was estimated by using measures of each year as a random replication according to methods proposed by Dirlewanger *et al.* (2012). Estimation was obtained from the analysis of variance based on the random linear model:

$Y_{ij} = \mu + y_i + g_j + e_{ij}$

where Y_{ij} is the phenotypic value of jth progeny in ith year; μ is the mean value of the trait; y_i is the random effect of the ith year on the trait; g_j is the random genotypic effect of progeny j; and e_{ij} is the year \times genotype interaction, i.e. residual of the model. Observations on a progeny are repeated measurements.

H_{BS} was estimated using the following equations:

$$H_{BS} = \frac{s_g^2}{s_g^2 + \frac{s_g^2}{n}}$$

where $s_g^2 = (MSg-MSresidual) n^{-1}$ is the genetic variance, MSg is the estimated mean square of genotypes, MSresidual is the estimated mean square of residual error, s^2 is a measure of variability due to genotype × year interaction, and *n* is the number of years in the experiment. The statistical analyses were performed using RCommander package of the software R 2.15.0 (R_Development_Core_Team, 2012).

Genotyping and map construction

The two progenies and their parents were genotyped using SNP markers from the RosBREED cherry 6K SNP array v1 (Peace *et al.*, 2012). Mapping analyses were performed using JoinMap® 4.0 (van Ooijen, 2006) according to the mapping protocol previously described by

Klagges et al. (2013).

 $R \times L$ progeny was used previously for genetic map construction using SSRs (Dirlewanger *et al.*, 2004b) and SNPs (Cabrera *et al.*, 2012; Klagges *et al.*, 2013), but for the QTL analysis, the initial map of 687 markers developed by Klagges *et al.* (2013) was simplified. Markers situated closer than 2 cM were deleted to ease computing analysis. The R×G progeny was used for the first time in this study to construct a new sweet cherry genetic linkage map using the same array and protocol.

Haldane's mapping function was used to convert recombination frequency into map distance as it is used by MultiQTL (see below). Although peach physical map based on peach physical genome v1.0 provided a reference for comparisons of linkage map output, no fixed order for the SNP markers was forced. The graphical presentation of linkage maps was performed using the MapChart software version 2.2 (Voorrips, 2002).

Quantitative Trait Loci analysis

Multiple interval mapping was performed using MultiQTL V2.6 software (Haifa, Israel, 2005; <u>http://www.multiQTL.com</u>). According to the principles of multiple interval mapping, a QTL with the highest effect is first found and it is taken as a cofactor to control the genetic background, whereas another QTL is searched in a different position. This procedure, repeated until no further QTL is found, takes into account effects of the QTLs present in other chromosomes.

Two types of analyses were performed. Each year was analyzed independently for each trait in order to examine the stability of the QTLs. Analysis combining all years together was performed using the multiple environment option available, increasing the accuracy of the QTL detection.

To declare statistically significant the presence of a QTL, type I error at the chromosome level (α_{chr}) was calculated using the following relationship: $\alpha_{chr} = 1 - (1 - [1 - (1 - \alpha_g)^{1/M}])^m$ where *M* is the total number of markers used for the QTL detection on each map and *m* the number of markers in the LG (Saintagne *et al.*, 2004). A genome-wide type I error (α_g) of 5% was chosen. The proportion of the phenotypic variation explained by the QTL (*EV*) was calculated as: $EV = \frac{1}{4}(\frac{d^2}{\alpha_{ph}}^2)$ where d^2 is the estimated substitution effect of the QTL (d=X(A)-X(B), A and B the two homozygote genotypes at the marker loci) and α_{ph} is the phenotypic variance of the trait. The graphical presentation of linkage maps and QTL was obtained using the MapChart software version 2.2.


Fig. 1 Chill portion (CP) (continuous line) and growing degree hours (GDH) (dashed line) accumulation in the field for the years of study (blue, 2009/2010; red, 2010/2011; green, 2011/2012). The values for fulfillment of chilling and heat requirements for each year are indicated for the sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars 'Regina' (squares) and 'Garnet' (stars).

In silico CG research

Chromosomal regions for *in silico* CG analysis were initially selected based on the location of the QTLs associated with CR and FD predicted peach protein sequences derived from scaffolds underlying the major QTL on LG4 were downloaded from the Genome Database for *Rosaceae* (http:// www.rosaceae.org/node/355) and blasted against the NCBI nr database using blastp in the program Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) with a E-value cutoff of 0.001 Blast2GO was then used for the Gene Ontology (GO) annotation.

Results

Phenotypic analysis, correlations and heritability

All three flowering traits showed high interannual variability (Table S1). In the cool winter 2009/spring 2010, we observed the highest CR and the latest FD (75.4 CP and 11th April for $R \times G$ and 12th April for $R \times L$, respectively). In spring 2011, we observed FDs were earlier (31th March for $R \times G$ and 4th April for $R \times L$). In winter 2011/spring 2012 the lowest mean value of CR (58.7 CP) was observed. Chill and heat accumulations on the experimental field were markedly different between years (Fig. 1). Chill accumulation was lower and delayed in 2012 compared to 2010 and 2011. No chill accumulation was achieved in the two first weeks of February 2012 due to an abnormal frost period (current dormancy models do not considers the chill effect of temperatures below 0 °C). Likewise, a variation was observed for heat accumulation according to the year of evaluation. In 2010 heat accumulation was lower and more irregular than in 2011 and 2012 (Fig. 1).

These different patterns of chilling and heat accumulation modeled the distribution of each trait according to the year of evaluation (Fig. 2). For example, in 2011 FD showed a low distribution amplitude (8 days and 9 days for $R \times G$ and $R \times L$, respectively) and earlier mean value due to the high chill and high heat accumulated compared to 2010 and 2012. On the contrary, in 2010 mean FD was later than in 2011 or 2012 due to the lower heat accumulation registered.

No trait followed a normal distribution according to the statistical Shapiro-wilk test, except for HR in $R \times G$ in 2011 (Fig. 2). Distributions were markedly skewed in $R \times G$ for CR and HR on 2012, the year of lower and more delayed chill accumulation. Transgressive segregants, having a phenotype beyond their parents, were identified for the three traits.

As expected, FDs and CR were positively correlated with one another from year to year, and HR was generally, but not always, negatively correlated with chilling (Table 1). Surprisingly,



Fig. 2 Distribution of chilling requirement (CR) in chill portion (CP) (a), heat requirement (HR) in growing degree hours (GDH) (b) in 'Regina' \times 'Garnet' progeny (R \times G) and flowering date (FD) in Julian days in 'Regina' \times 'Lapins' (R \times L) (c) and R \times G (d) progenies. Data of each parent are indicated by arrows ('Regina' in purple; 'Garnet' in orange; 'Lapins' in green).

no significant correlation was found for HR for either 2010 or 2011 with 2012, the year with delayed chill accumulation. Similarly, HR was positively correlated to FD in all years but the year with delayed chill accumulation.

 H_{BS} was 84% for CR and 43% for HR in R×G. Regarding FD, H_{BS} was 92% and 91% in R×L and R×G, respectively.

Table	1	Spearman	correlation	coefficients	of chill	requirement	and	heat	requirement	and
floweri	ng	date in pro	ogenies duri	ng different	years of o	observation.				

R×L	FD-2006	FD-2008	FD-2009	FD-2010	FD-2011					
FD-2008	0.59*									
FD-2009	0.63*	0.78*								
FD-2010	0.59*	0.75*	0.88*							
FD-2011	0.70*	0.67*	0.73*	0.75*						
FD-2012	0.66*	0.66*	0.74*	0.69*	0.70*					
R×G	CR-2010	CR-2011	CR-2012	HR-2010	HR-2011	HR-2012	FD-2008	FD-2009	FD-2010	FD-2011
CR-2011	0.63*									
CR-2012	0.70*	0.66*								
HR-2010	-0.45*			+			+			
HR-2011		0.25		0.35*						
HR-2012			-0.34*	0.27	0.09					
FD-2009				1			0.82*	-		
FD-2010	0.51*			0.46*			0.77*	0.88*		
FD-2011		0.52*			0.92*		0.74*	0.84*	0.77*	
FD-2012			0.62*	-		0.06	0.74*	0.79*	0.78*	0.80*

CR, chill requirement; HR, heat requirement; FD, flowering date; R×G, Regina × Garnet progeny; R×L, Regina × Lapins progeny. Traits are named as xx-yyyy, xx: trait acronym; yyyy: years of evaluation. Significant correlation (P<0,001) are indicated by a star.

Linkage maps

For R×L, the parental maps used for QTL detection consist of 136 and 127 SNP markers over eight LGs covering 712.4 and 710.4 cM for 'Regina' and 'Lapins', respectively (Table S2). For R×G progeny, 723 SNP markers were included in the initial map. Markers were organized into eight LGs. These maps used for QTL detection consist of 142 and 137 markers covering 657.6 cM and 823.6 cM for 'Regina' and 'Garnet', respectively (Table S2).

QTL analysis

Chilling requirement. For the R×G progeny, QTLs were detected on five LGs, LG1 for 'Garnet' and LG1, 2, 4, 6 and 7 for 'Regina' (Fig. S1, Table 2a). A major QTL was detected for all years on LG4 of 'Regina' with a very small confidence interval and an explained variation (EV) of 22%, 18.1% and 16.2% in 2010, 2011 and 2012, respectively (Fig. 3). The

Table 2 QTLs detected using year-by-year and multi-year analysis for: (a) chill requirement and (b) heat requirement for 'Regina' \times 'Garnet' progeny (R×G) and flowering date for (c) 'Regina' \times 'Lapins' progeny (R×L) and (d) R×G.

(a)							(b)						
R×G	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV	d	R×G	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV	d
Years							Years						
2010	R1	54.5	[14.6;94.4]	4.0	9.8	-4.0	2010	R1	67.0	[47.9;86.0]	4.9	15.6	273
	R2	49.5	[26.0;73.0]	3.7	9.6	-4.0		G1	37.2	[0.0;126.4]	3.5	9.8	221
	R4	22.3	[17.5;27.0]	8.3	22.0	6.0		G3	95.0	[68.1;100.3]	4.2	13.4	253
	G1	27.1	[0.0;103.5]	3.5	13.4	-3.6	2011	R4	22.5	[11.6;33.4]	9.7	33.3	524
2011	R4	20.6	[15.7;25.5]	6.6	18.1	4.0		G6	21.6	[9.3;33.9]	6.0	21.1	-418
2012	R4	22.3	[3.5;41.2]	5.1	16.2	5.3	2012	R7	12.9	[0.9;25.0]	3.6	13.7	-460
	G1	55.6	[0.0;126.6]	3.6	14.8	-4.4	Multi-Years	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV_{mean}	d_{mean}
Multi-Years	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV_{mean}	d_{mean}		R1	61.9	[28.3;95.5]	6.0	6.4	137
	R1	35.4	[0.0;74.6]	8.5	7.4	-3.1		R4	19.0	[11.0;27.1]	10.7	10.9	208
	G1	39.4	[0.0;104.8]	7.9	9.7	-3.1		G1	75.7	[0.0;151.2]	5.9	5.3	175
	R2	52.9	[27.3;76.7]	7.6	6.5	-2.8		G3	98.9	[89.1;100.3]	8.3	7.9	220
	R4	21.0	[18.9;23.1]	20.8	17.5	5.0		G6	24.5	[16.9;32.0]	11.0	10.9	-308
	R6	80.4	[66.1;81.7]	7.6	6.0	-2.7		G8	55.0	[17.1;72.1]	7.0	6.3	219
	R7	50.8	[30.9;57.6]	7.3	5.8	2.7							
(c)							(d)						
R×L	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV	d	R×G	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV	d
Years						<u> </u>	Years						
2006	R4	32.6	[10.3;54.9]	4.8	18.7	2.2	2008	R3	33.4	[6.2;60.6]	2.7	5.5	-1.9
2008	R4	29.1	[19.9;38.3]	6.4	19.0	3.2		R4	22.0	[16.6;27.3]	12.1	30.5	4.6
2009	R4	28.3	[20.6;36.0]	11.5	31.8	3.1		R6	75.7	[52.9;81.7]	4.2	9.1	-2.5
	R5	9.2	[0.0;41.33]	2.8	6.6	1.2		R7	6.3	[0.0;22.5]	3.4	6.9	-2.0
2010	R4	27.8	[18.8;36.8]	9.6	27.4	1.7		G1	109.6	[62.4;151.2]	4.3	17.1	3.1
	R5	13.8	[0.0;57.5]	3.2	8.3	0.5	2009	R1	19.0	[0.0;52.2]	3.7	5.9	-1.5
2011	R4	29.7	[16.7;42.8]	5.6	19.6	1.6		R4	22.8	[18.5;27.2]	24.1	45.8	4.4
	L1	131.7	[66.6;152.2]	3.3	13.1	1.3		R6	71.7	[61.8;81.6]	7.7	10.5	-2.1
2012	R4	29.9	[21.5;38.3]	8.5	25.4	2.0		R7	55.9	[45.3;57.6]	6.6	8.5	1.8
	L1	122.0	[50.4;152.2]	3.2	12.9	1.4	2010	R4	21.5	[15.7;27.2]	15.3	42.1	2.0
Multi-Years	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV_{mean}	d_{mean}		R7	34.9	[0.0;57.6]	2.7	5.9	0.1
	L1	146.9	[144.2;149.6]	17.1	8.0	1.4	2011	R4	20.0	[13.1;26.9]	13.7	36.7	2.8
	L2	65.5	[45.4;70.3]	8.0	3.3	0.8		R6	66.6	[23.4;81.7]	3.1	6.8	-1.2
	R4	29.6	[27.9;31.2]	47.0	21.2	2.2		G6	24.3	[6.6;42.1]	4.8	14.4	-1.8
	R5	5.2	[0.0;36.51]	11.3	4.4	0.7	2012	R4	21.6	[18.2;25.1]	12.5	36.2	2.3
	R8	45.4	[30.9;55.0]	9.3	4.0	0.8	Multi-Years	LG	L(cM)	CI (95%)	LOD	EV_{mean}	d_{mean}
								R1	19.5	[0.0;50.6]	9.9	4.0	-0.9
								G1	111.2	[96.2;126.3]	14.2	7.5	1.4
								R2	29.5	[16.9;42.2]	7.4	2.9	-0.8
								G2	14.2	[1.0;27.4]	10.5	5.4	-1.2
								G3	88.0	[31.3;100.3]	7.4	4.1	0.8
								R4	20.4	[18.4;22.5]	76.1	36.3	3.1
								G5	11.5	[0.0;28.7]	6.8	3.5	-0.9
								R6	69.1	[49.1;81.7]	11.8	4.1	-1.0
								G6	23.8	[19.2;28.4]	20.5	12.1	-1.9
								R7	51.0	[19.7;57.6]	13.5	4.7	0.8
								G8	53.8	[10.8;72.1]	6.9	3.4	0.9

LG, Linkage group; L, distance from the beginning of the chromosome to the point of maximum LOD in the interval; CI, confidence interval; LOD, logarithm of the odds ratio; EV, variation explained by the QTL in percentage of the total variation explained; EV_{mean} , mean of EV in the multiple environment approach ; d: difference X(A)-X(B) according to the year of evaluation, where A and B are the two homozygotes at the marker loci; d_{mean} , mean of d in the multiple environment approach; (+/-): the sign varies according to the year of evaluation

QTL on LG1 of 'Garnet' was detected in 2010 and 2012 analyses with an EV of 13.4% and 14.8% respectively. QTLs on 'Regina' LG1 and LG2 were detected only in 2010. Using multi-years analysis, these QTLs were detected as well as other QTLs with lower EV on LG6 and LG7 of 'Regina'.

Heat requirement. For the progeny $R \times G$, QTLs were detected on seven LGs, LG1, 3, 6 and 8 for 'Garnet' and 1, 4 and 7 for 'Regina' (Fig. S1, Table 2b). QTLs detected were different for each year. QTLs with the highest EV were detected in 2011: on LG4 of 'Regina' (EV=33.3%) and on LG6 of 'Garnet' (EV=21.1%). Using multi-years analysis, these QTLs, except the one located on LG7 of 'Regina', were detected. Surprisingly, this QTL on LG7 was the only one detected in 2012, the year of delayed chill accumulation. QTLs with the highest effect were detected on LG4 of 'Regina' and LG6 of 'Garnet' with an EV of 10.9%. Another QTL with a lower EV was detected on LG8 of 'Garnet', only by the multi-years analysis.

Flowering date. One major QTL was detected in the two progenies and for all years on LG4 of 'Regina' with a small confidence interval and an EV that reached 31.8% and 45.8% for R×L and R×G, respectively (Fig. 3, Table 2c, d). For the R×L progeny, QTLs were also detected on LG1 of 'Lapins' in 2011 and 2012 and on LG5 of 'Regina' in 2009 and 2010. Two other minor QTLs were only detected with multi-years analysis, on LG2 of 'Lapins' and LG8 of 'Regina'. More QTLs were detected within the R×G than within the R×L progeny; in fact, QTLs were detected on all linkage groups. QTLs for 'Regina' on LG6 and LG7, were both detected for three years, although the maximum EV was 10.5%. On the opposite, QTLs on LG1 and LG6 of 'Garnet' were detected only for one year but with high EV, 17.1% in 2008 and 14.4% in 2011, respectively. Using multi-years analysis, all QTLs detected in single-year analyses were found except the QTL on LG3 of 'Regina'. Also, five new QTLs were detected (on LGs 2 of 'Regina' and 2, 3, 5 and 8 of 'Garnet') but all had small EV.

Haplotype analyses. Haplotypes were constructed with SNP markers segregating in the major QTL on LG4, nine and three markers were used for the R×G and R×L, respectively (Table S3a). As parental maps were built for QTL analysis using markers only segregating in one parent, two alleles were obtained in each diploid progeny. The mean values of CR, HR and FD for the two haplotypes were calculated for each year of evaluation (Table S3b). Significant differences between the two haplotypes were found for each year for CR and FD. As for HR, a significant difference was only obtained for 2011. Regarding CR, the differences between the haplotypes ranged from 3.77 to 5.15 CP, for FD, values ranged from 1.7 to 3.8 Julian days and for HR it was 504.8 GDH (2011). The highest difference was observed in 2012 for CR and 2009 for FD for the two progenies. In all cases the 'Regina' haplotype increased the value for each trait.



Fig. 3 Quantitative trait loci (QTLs) located in linkage group 4 (LG4) of the sweet cherry (*Prunus avium*) cultivar 'Regina' (R4) detected using 'Regina' × 'Lapins' (R × L; left) and 'Regina' × 'Garnet' (R × G; right) progenies. Results for each year are indicated by open bars and are given as xx-yyyy (xx, trait acronym; yyyy, year of evaluation). Those obtained using 32multi-year analyses in MULTI QTL are indicated by closed bars and given as xx-MY. Bars are blue for chilling requirements (CR), red for heat requirements (HR) and green for flowering date (FD). Solid bars denote the most probable position of the QTL obtained from the highest LOD score position given by the MIM and the bootstrap (1000 permutations) \pm SD. Confidence intervals (a<5%) are represented as lines. The distance between markers is represented in cM. Markers present in both families are in bold, italic and underlined

In silico CG research

In silico CG analysis was performed within small confidence intervals found for the QTLs on LG4. The region covered by the confidence intervals was reduced thanks to the high number of phenotyping years and to the high heritability of the traits. Other QTLs were dismissed for in silico CG analysis due to the large size of the confidence interval. These intervals on LG4, expressed in bp of the peach physical position, considerably overlapped: 6,580,288-9,412,384 bp (FD in R×L), 6,789,121-8,045,747 bp (FD in R×G), and 7,075,445-8,196,058 bp (CR in R×G) (Fig. 3). In order to include QTLs for both FD and CR, 2,830,000 bp from 6,580,288 bp of the scaffold 4 were screened. In this region, 429 genes were predicted on the peach ('Lovell') genome (Table S4), from which one had no Blast hit in databases and 47 had Blast hits with unknown proteins. Data mining based on predicted protein function and their potential involvement in flowering and dormancy resulted in the selection of nine CGs (Table 3, Fig. S2). Among them, CGs with gene ontologies related to different processes were found: negative regulation of flower development -NUCLEAR PORE ANCHOR (NUA), PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1), EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2), ACTIN-RELATED PROTEIN 4-LIKE (ARP4) -, photoperiodism (ARP4), gibberellin metabolism - ENT-KAURENE SYNTHASE (KS), GA20 OXIDASE (GA20ox), GIBBERELLIN 2-OXIDASE (GA2ox) – and vernalization (EMF2) (Table 3). In the same interval, 13 miRNAs target genes (ppa024905m, ppa022903m, ppa011349m, ppa018824m, ppa001477m, ppa008801m, ppa000550m, ppa008304m, ppa019339m, ppa000901m, ppa016261m, ppa008637m, ppa003898m) already reported in peach by Barakat et al. (2012) were found.

Discussion

Despite considerable efforts to understand the effects of the environment on growth and flowering, very little is known about the molecular and genetic mechanisms that control flower development in sweet cherry (Yu *et al.*, 2012). The present study clearly shows the polygenic control of CR and FD in sweet cherry.

Phenotypic analysis, correlation and heritability

The time-consuming process of evaluating CR is a major drawback for phenotyping this important breeding trait. Previous studies within the *Rosaceae* family consisted in two-year analysis: in almond (Sanchez-Perez *et al.*, 2012), apricot (Olukolu *et al.*, 2009) and peach (Fan *et al.*, 2010). This three-year QTL study for CR performed in a *Rosaceae* species

Gene Ontology - Biological process	gative regulation of flower velopment; protein import into cleus	berellin biosynthetic process	berellin biosynthetic process	berellin biosynthetic process	gative regulation of flower velopment; chromatin nodeling	berellin process; oxidation- duction process	berellin catabolic process; idation-reduction process	rnalization response; negative gulation of flower velopment; histone :thylation	ng-day photoperiodism, wering
E-value	DEO dei nuo	0E0 gib	0E0 gib	3,19E-111 gib	0E0 der ren	1,32E-146 rec	gib 0E0 oxi	ver 0E0 dev me	0E0 flor
Similarity	81%	91%	77 %	75%	74%	77%	92 %	88%	94%
Match ID (accession)	XP_004293787.1	AEN74904.1	AEN74904.1	AEN74904.1	XP_002882790.1	XP_002517548.1	ACT99992.1	XP_004300676.1	XP_002275561.2
Sequence length (aa)	2 039	745	383	337	2 030	316	334	646	401
Transcript start	6 823 622	7 070 520	7078 032	7087 518	7 488 534	7 983 415	8 581 870	8 728 803	8 820 787
Peach gene ID	ppa000061m	ppa001902m	ppa018714m	ppa019543m	ppa000063m	ppa020361m	ppa008414m	ppa002685m	ppa006685m
Description	nuclear-pore anchor-like	ent-kaurene synthase	ent-kaurene synthase	ent-kaurene synthase	photoperiod-independent early flowering 1	gibberellin 20-oxidase	gibberellin 2-oxidase	embryonic flower 2	actin-related protein 4-like
Gene	NUA	ks	KS	ks	PIE1	GA20ox	GA2ox	EMF2	ARP4

Table 3 Candidate genes located in the QTL on linkage group 4

under markedly different winter and spring conditions let us identify interesting cues about the interaction of CR and HR in a segregating population. The skewness from normality and differences in segregation could be related to the environmental effect. For example, the bimodal distribution of FD in R×L during 2010 (Fig. 2) can be related to the irregular and delayed heat accumulation period (Fig. 1) whereas the skewed distribution of CR during 2012 (Fig. 2) may be associated to the delayed chill accumulation and the frost period at the beginning of February. The delayed and reduced chill accumulation registered in 2012 can be associated to the reduced fruit set and productivity found for many high chill varieties (data not shown), a negative effect of insufficient chilling fulfillment described for temperate fruit trees.

The mean values and distributions of CR, HR and FD are related to the different patterns of chill and heat accumulation registered between years. For each year, the mean value of CR is related to the total chill accumulation in the field. Between different years, the higher the chill accumulated in the field conditions the higher the CR calculated. This is in agreement with previous findings in sweet cherry (Alburquerque *et al.*, 2008), apricot (Campoy *et al.*, 2012), almond (Egea *et al.*, 2003), peach (Pawasut *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2010). In addition, significantly different CR has been found in clonal plant material cultivated in different climatic conditions in peach (Balandier *et al.*, 1993) and apricot (Campoy *et al.*, 2012). As for HR, the lower the CR of a cultivar the higher the HR, as previously found in peach (Pawasut *et al.*, 2004) and apricot (Campoy *et al.*, 2012), except for 2011 when no significant correlation was found. The higher FD values registered in 2010 for both families are related to the lower heat accumulation registered in this year (Table S1). In 2011, chilling accumulated was similar to that registered in 2010, but heat accumulation was considerably higher, which lead to an advance in FD for both populations (Fig. 1; Fig. 2).

 H_{BS} has been used as an index of reliability of phenotypic selection for genetic characteristics and the accuracy of QTL analysis considerably depends on the level of H_{BS} (Beavis, 1998). We show that in our mapping populations, H_{BS} was sufficiently high (>0.8) to enable genetic analysis of CR and FD, indicating that the values for the two traits were consistent over years. H_{BS} values for FD in both families were within the range of those found in other *Rosaceae* species: 0.84 in apple (*Malus domestica*) (Celton *et al.*, 2011); 0.92 in rose (Kawamura *et al.*, 2011); 0.89 and 0.85 in peach; 0.67 in apricot and 0.88 in sweet cherry (Dirlewanger *et al.*, 2012); and 0.91 in sour cherry (Wang *et al.*, 2000). The H_{BS} of CR (0.83) was similar to that found in peach (0.79) (Fan *et al.*, 2010). To our knowledge this is the first reported H_{BS} value for sweet cherry, showing the high genetic control of this trait in this species. On the contrary, H_{BS} value for HR was considerably lower (0.43) compared with FD and CR values. This is in

agreement with the previous study in peach, 0.54 (Fan et al., 2010). The lower H_{BS} for HR indicates a stronger genotype x year interaction for this trait. This is in agreement with the reduction of HR after the application of chilling beyond the fulfillment of the cultivar's CR, noted by several authors in different species (Couvillon & Erez, 1985; Ghelardini et al., 2010; Okie & Blackburn, 2011). Correlations between years for FD were similar in R×L and R×G, but higher than those found for CR in R×G. This may be explained by higher amplitude observed between the earliest and latest flowering genotypes compared with the amplitude between the high and low chill or heat genotypes (Fig. 1ab). However, in the case of HR, two out of three correlations were not significant. Non-significant correlations of HR coincided with 2012, the year of abnormal delayed chill accumulation. This is consistent with the influence of the residual effect of dormancy release (insufficient chilling accumulation) over HR found in Prunus (Couvillon & Erez, 1985; Okie & Blackburn, 2011). Correlation between CR and FD showed significant and constant values for the different years of evaluation as previously found in almond: 0.8-0.91; (Sanchez-Perez et al., 2012); and peach : 0.70-0.67 (Fan et al., 2010). On the contrary, correlations of these traits with HR showed a high variability between years, suggesting a high influence of the environmental conditions. These results are in agreement with the no effect of ample chilling accumulation over HR but the increase of HR when CR is not correctly fulfilled in peach (Okie & Blackburn, 2011). Similar results were found in elm (Ulmus ssp.) (Ghelardini et al., 2010).

Transgressive segregation, the appearance of individuals in segregating populations beyond the parental phenotypes, was evident among the $R \times G$ population for CR and HR and among $R \times L$ and $R \times G$ for FD. Transgressive segregants were found both positive (later dormancy release of flowering than 'Regina', the late flowering-high chill cultivar) and negative (precocious than either 'Lapins' or 'Garnet', early flowering-low chill cultivars) and could be useful for future breeding for climatic adaption in sweet cherry.

Linkage maps

Total coverage for the four parental maps was similar to those previously published for sweet cherry (Klagges *et al.* (2013). Parental maps were compared to the complete maps (Klagges *et al.*, 2013) and no rearrangement was found (data not shown). In R×L, distortions in the marker distributions at the top and bottom of LG6 were found concentrated only on 'Lapins'. These distortions could be associated to the presence of the male sterility and the gametophytic S locus, located on the top and bottom of LG6, respectively (Dirlewanger *et al.*, 2004b; Tao & Iezzoni, 2010). On the other hand, in R×G, distortions in marker distributions

were found only on the bottom of Garnet's LG6, probably associated to the gametophytic S locus.

Genetic determinism

Owing to limited population sizes, only QTLs with large effects were statistically significant and stable; therefore, the number of QTLs detected in this study should be considered as a minimal estimate. Six QTLs for CR and six QTLs for HR were mapped in R×G, whereas six and 11 QTLs for FD were mapped in R×L and R×G, respectively. QTLs with the highest EV were located in syntenic region in both progenies for FD. This similarity of results in two genetic backgrounds (different male parents), gives strength to the QTL detection performed. QTL clusterings were clear and consistent with the strong correlations previously shown between CR and FD (Table 1). This was especially clear for the major QTL detected on LG4 of 'Regina' in both R×L and R×G populations (Table 2, Fig. 3). This QTL colocalizes with a major QTL found in almond (Sanchez-Perez et al., 2012), apricot (Dirlewanger et al., 2012), peach (Fan et al., 2010; Dirlewanger et al., 2012) and sweet cherry (Dirlewanger et al., 2012). However, whether this pattern is due to pleiotropic effects of a single gene or to tightly linked genes is still to be determined. In spite of that, interesting co-localizations with CGs were found on LG4. On the other hand, other major QTLs for chilling and flowering phenology have been found in Prunus species. One major QTL for CR was identified on LG1 in peach co-localizing with a QTL for FD, and overlapping the evergrowing (EVG) region (Fan et al., 2010). Another QTL mapped on LG7 for CR co-localized also with a QTL for FD. These colocalizations suggested that a unique temperature sensor regulated both traits. Several CGs for dormancy release control have been reported in peach, such as DORMANCY ASSOCIATED MADS-box (DAM) genes (Leida et al., 2012b). Similarly, major QTLs for flowering phenology have been found in LG1 and LG5 in apricot (Campoy et al., 2011b; Socquet-Juglard et al., 2013). Within the sweet cherry progenies studied, QTLs for CR, HR and FD were also detected on LGs 1, 5 and 7 but all of them had minor to moderate effects and were not stable across years. Nevertheless, a co-localization for CR and FD was found on LG1 and LG7 of 'Regina', by using multi-years analyses (Fig. S1). Whether the differences in QTL detection found between these closely related species are due to a different genetic determinism or just a different allelic dotation of progeny parents is still to be determined. The use of different genitors, and in particular of low-chill varieties, for establishing new mapping progenies as well as association mapping analyses will help to clarify this uncertainty.

The identification of the QTL on LG4 in progenies from different, even if related, genetic backgrounds analyzed during several years gives robustness to our results. In addition the significant differences observed for the two haplotypes for each year for CR and FD indicate that by using the selected SNP markers it is possible for breeders to develop an approach to build ideotypes better adapted for the predicted environmental conditions due to climatic change. A difference of nearly four days for FD was observed between the two haplotypes while the amplitude within the complete population was of 15 days. Moreover, according to the high synteny among *Prunus* (Dirlewanger *et al.*, 2004b) and the co-localization of other QTLs for FD within *Prunus* (Dirlewanger *et al.*, 2012) we can expect that the same process could be developed within the *Prunus* genus.

The low H_{BS} of HR, high by-year interaction and colocalization with CR-QTL regions, suggest not only the low genetic control underlying this character but the interaction with CR fulfillment. In addition, the colocalization of CR and HR could be associated to the difficulty of phenotyping the complete release of dormancy and therefore the beginning of the heat accumulation period. This reflects the need of an accurate phenotyping method to unambiguously characterize dormancy release. To date the forcing methods are the most used option, but still remain insufficient.

CGs analysis

A scan over the region comprising the confidence intervals for the QTLs involved in chilling and flowering phenology on LG4 allowed us to identify candidate genes for these traits (Table 3). Gene ontologies of those genes were associated either to gibberellin biosynthesis pathway or to negative regulation of flower development. On the opposite, no obvious function related to the control of dormancy was found for the 13 miRNAs target genes located in the same region. The putative role and interactions of the candidate genes are described as follows:

CGs involved in the gibberellin biosynthesis pathway: KS, GA20ox, GA2ox

KS converts *ent*-copalyl diphosphate (CDP) to ent-kaurene, an early intermediate in GA biosynthesis (Yamaguchi, 2008). There are evidences that ent-kaurene biosynthesis is controlled by environmental conditions such as photoperiod (Zeevaart & Gage, 1993), temperature (Moore & Moore, 1991) as well as by plant development (Silverstone *et al.*, 1997).

GA20ox is a key enzyme for gibberellin biosynthesis (Yamaguchi, 2008) and it promotes flowering in *Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)* (Rieu *et al.*, 2008).

GA2ox is an enzyme related to gibberellin inactivation (Yamaguchi, 2008).

Bioactive GAs act as key mediators between the perception of environmental signals and the resulting growth responses. Gibberellins have important roles in promoting transcription of FLOWERING TIME LOCUS (FT), TWIN SISTER OF FT (TSF) and SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes during floral induction in response to long days in Arabidopsis (Porri et al., 2012). Increases in gibberellin levels were reported to be necessary for endodormancy release (Lavee, 1973). Recent evidence indicates that GA biosynthetic genes are induced by long-term chilling exposure in dormant buds, being associated with the acquisition of growth ability (Rinne et al., 2011). In peach, endogenous GA levels are fine-tuned during dormancy/activity transitions in flower buds (Reinoso et al., 2002). Transcriptome analysis of Japanese pear flower buds at endodormancy and endodormancy release stages revealed that transcripts of GA20ox were less abundant in ecodormancy, whereas the genes encoding GA2ox showed up-regulated expression in ecodormancy (Bai et al., 2013). In almond, the distinct expression pattern of both PdGA20OX and PdGA2OX suggested that, prior to anthesis, there is a genetic reprogramming of the GA metabolic pathway (Barros et al., 2012). In a similar fashion, expression regulation of KS and/or GA20ox and/or GA2ox detected on the QTL region may participate in endodormancy release in sweet cherry.

CGs involved in negative regulation of flower development: NUA, PIE1, ARP4, EMF2 NUA is the *Arabidopsis* homolog of TRANSLOCATED PROMOTER REGION (TPR) and is one of the few nuclear pore proteins conserved between animals, yeast and plants. Four T-DNA insertion lines were characterized, which comprise an allelic series of increasing severity for several correlating phenotypes, such as early flowering under short days and long days, increased abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER (SUMO) conjugates, altered expression of several flowering regulators, and nuclear accumulation of poly(A)+ RNA (Xu *et al.*, 2007a). *FLOWERING LOCUS* C (*FLC*) mRNA level is strongly reduced in nua-1 and nua-4. Consistently, *FT* and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (SOC1) mRNA levels were found inversely affected (Xu *et al.*, 2007b).

PIE1 and *ARP4*: *PIE1* is the ortholog in *Arabidopsis* of *Saccharomyces cerevisiae Swr1*, the catalytic subunit of the ATP-dependent chromatin remodeling complex SWR1. PIE1 is required for high-level expression of FLC possibly via H2A.Z deposition onto target chromatin including FLC (Deal *et al.*, 2007). Other homologs of SWR1 complex components in *Arabidopsis* include ARP4 and ARP6. Mutations in any of these homologs cause an early-flowering phenotype through the reduction of FLC expression (Choi *et al.*, 2007). Thus, FLC activation, and the resulting creation of a vernalization requirement in *Arabidopsis*, requires deposition of H2A.Z via PIE1, ARP4, and ARP6, for review see Kim *et al.* (2009b).

EMF2: the EMBRYONIC FLOWER genes are required to maintain vegetative development in *Arabidopsis* (Moon *et al.*, 2003). The EMF genes have been shown to regulate flowering time because modulation of EMF activities generates transgenic plants that flower at different times (Aubert *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). EMF2 encodes a Polycomb group protein. The *Arabidopsis* Polycomb repressive complex 2 (PRC2) subunits CURLY LEAF, EMF2 and FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM repress the expression of FLC (Jiang *et al.*, 2008). In addition, PRC2 plays a prominent role in establishing an epigenetic cellular memory for cold-regulated expression states of AGAMOUS-LIKE 19 and FLC during the vernalization response (Alexandre & Hennig, 2008). Therefore, EMF2 could be implicated not only in the control of FD but also in the control of CR. The possible role of chromatin modifications in dormancy and flowering regulation has been previously suggested, for review see Horvath (2009).

The proteins encoded by these CGs regulate, directly or indirectly, the expression of the floral pathway integrator FLC, which repress the expression of FT. Since we did not find an FLC ortholog on either peach genomic sequence or on the 'Regina' sweet cherry transcribed sequences (unpublished data), another protein may be a FLC substitute in these perennial trees. DAM factors are considered as the main candidates to control bud dormancy and meristem growth cessation in peach and other perennial plants, through gene expression regulation (Mazzitelli et al., 2007; Horvath et al., 2008; Yamane et al., 2008; Li et al., 2009; Horvath et al., 2010; Sasaki et al., 2011; Leida et al., 2012b; Verde et al., 2013). Moreover, DAM5 and DAM6 expression patterns in peach are consistent with a role as quantitative repressors of bud break (Jimenez et al., 2010; Yamane et al., 2011). Additionally, analysis of chromatin modifications reinforced the role of epigenetic mechanisms in DAM6 regulation and bud dormancy release (Leida et al., 2012b) Thus, DAM6 could be a potential FLC substitute. Repression of DAM6 may be necessary for dormancy release after fulfilling the chilling requirement in peach and sweet cherry. In peach, specific chromatin histone modifications in the DAM6 gene occurred during bud dormancy progression and release and were associated with repression of DAM6 (Leida et al., 2012b). In sweet cherry a colocalization for CR and FD was found on LG1 overlapping the evergrowing region where DAM6 gene has been found in peach (Bielenberg et al., 2008). Taken together, these data suggest a possible expression regulation of DAM6 leading to endodormancy release by one or a combination of the CGs detected on the GL4 QTL, through: (1) histone modification (via PRC2 containing EMF2) and/or (2) through the deposition of histone variant H2A.Z (via the cherry SWR1 complex homolog containing PIE1 and ARP4) and/or (3) through an unknown mechanism implicating NUA. It is interesting to note that H2A.Z is supposed to act specifically as a thermosensor in plants (Kumar & Wigge, 2010).

Together, these results provide the first insights of dormancy and FD control in sweet cherry. Moreover, we provide the first haplotype analysis for CR in sweet cherry, opening new avenues for the construction of ideotypes adapted to the upcoming climatic conditions. Nonetheless, transcriptomic, association genetics and epigenetics approaches could provide new understandings of the complex process involved in dormancy release and flowering time control.

Acknowledgements

This work was supported by the Aquitaine region and by INRA in the Meta Program ACCAF. We thank the technical team of laboratory, Jacques Joly and Lydie Fouilhaux, for producing the hybrids and phenotyping, and the Fruit Experimental Unit of INRA – Bordeaux for growing the trees. JA Campoy is holder of a postdoctoral fellowship from the 'Programa de Formación Postdoctoral de 'Personal Investigador' of the 'Fundación Séneca'—Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia', Spain.

Supporting information

Supporting Tables

Table S1. Mean values, SD and value range for each trait for each sweet cherry (Prunus avium) progeny during different years of evaluation.

degree hours (Ric Winter/Spring	2005/2006	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012
Chill requirement						
R×G						
$Mean \pm SD$	I	I	I	75.4 ± 6	69.7 ± 4.6	58.7 ± 6.7
Minimum	I	I	I	56.2	57.7	43.3
Maximum	I	I	1	89.4	78.3	70.2
Heat requirement						
R×G						
$Mean \pm SD$	I	I	I	6844.9 ± 340.8	6957.2 ± 456.9	6855.3 ± 636.8
Minimum	I	I	I	5464	5655	5467
Maximum	I	I	I	8010	8212	8593
Flowering date						
R×L						
$Mean \pm SD$	96.9 ± 2.6	94.7 ± 3.7	98.7 ± 2.7	102.5 ± 1.6	92.6 ± 1.9	96.2 ± 2.1
Minimum	91	84	06	67	87	91
Maximum	102	109	106	106	98	105
R×G						
$Mean \pm SD$	I	92.6 ± 4.1	93.4 ± 3.3	101.3 ± 1.5	90.7 ± 2.3	95.0 ± 1.8
Minimum	I	79	85	67	85	89
Maximum		100	100	105	95	100

Table S2. Markers used in the parental maps for QTL detection in sweet cherry (Prunus avium).

application/msexcel (75K)

 $\label{eq:http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/nph.12658/asset/supinfo/nph12658-sup-0004-TableS2.xlsx?v=1&s=96e4dea17a857254c32ee8b0dda578711d7d4c1c}$

Table S3 Haplotype analysis using SNP markers spanning the QTL on linkage group 4 in sweet cherry (Prunus avium) progenies 'Regina' \times 'Garnet' (R \times G) and 'Regina' \times 'Lapins' (R \times L). (a) SNP markers used to characterize haplotypes. (b) Means values of each traits for the two haplotypes in both progenies. Number of observation are indicated in parenthesis. Significant difference between means (P>0,05) are indicated by a star.

(a)				
Population	SNP markers	Position (cM)	haplotype ¹	
			1	2
R × G	Rtart_4_03136281	2.220	А	G
	Rsweet_4_05231853	14.698	А	G
	Rsweet_4_05490025	16.652	А	G
	Rtart_4_07070007	19.460	А	С
	Rsweet_4_07309282	20.432	G	А
	Rsweet_4_07944355	22.377	G	А
	Rsweet_4_07835311	23.067	А	G
	Rsweet_4_08737179	26.770	А	G
	Rsweet_4_12567325	40.615	А	G
R × L	Rsweet_4_06580288	24.088	G	А
	Rsweet_4_08950735	29.266	G	А
	Rsweet_4_10071883	33.437	С	А

¹ 'Regina' (R) haplotype is haplotype 1; 'Garnet' (G) haplotype is haplotype 2

(b)				
Population	Trait	years	haplotype	
			1	2
R × G	Chill requirement (CP)	2010	77,81* (55)	72 <i>,</i> 96* (52)
		2011	71,65* (55)	67,88* (52)
		2012	61,14* (55)	55 <i>,</i> 99* (52)
	Heat requirement (GDH)	2010	6908,77 (40)	6817,37 (40)
		2011	7237,40* (40)	6732 <i>,</i> 60* (40)
		2012	6953,65 (40)	6963 <i>,</i> 05 (40)
	Flowering Date	2008	94,38* (54)	91 <i>,</i> 00* (53)
		2009	95,34* (58)	91 <i>,</i> 46* (54)
		2010	102,13* (58)	100 <i>,</i> 40* (54)
		2011	91,93* (58)	89 <i>,</i> 44* (54)
		2012	95,94* (58)	93 <i>,</i> 98* (54)
R × L	Flowering Date	2006	98,04* (51)	95 <i>,</i> 86* (50)
		2008	95,98* (56)	92 <i>,</i> 88* (51)
		2009	100,10* (57)	96 <i>,</i> 98* (52)
		2010	103,26* (57)	101 <i>,</i> 56* (52)
		2011	93,21* (57)	91,67* (52)
		2012	97,03* (57)	95 <i>,</i> 03* (52)

Table S4 Genes located in the QTL on linkage group 4 in sweet cherry (Prunus avium) with

 the corresponding Blast2GO analysis

application/msexcel (53K)

 $\label{eq:http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/nph.12658/asset/supinfo/nph12658-sup-0006-TableS4.xlsx?v=1&s=a8ad6a87d55abde7f5b6dead840bc18d7e4d3be5$

Supporting Figure

Fig. S1 Linkage maps and QTL analysis in two sweet cherry (Prunus avium) progenies 'Regina' \times 'Lapins' and 'Regina' \times 'Garnet' for chilling requirements (CR), heat requirements (HR) and flowering date (FD).





Fig S1 Linkage maps and Quantitative Trait Loci (QTL) analysis in two progenies 'Regina' × 'Lapins' (left) and 'Regina' × 'Garnet' (right) for chilling requirements (CR), heat requirements (HR) and flowering date (FD). Only results using multi-years analyses (MY) from MultiQTL are shown. Linkage group are named as Zy, Z: parent acronym (R, 'Regina'; L, 'Lapins'; G, 'Garnet'); y: number of linkage group. QTLs are indicated by bars (Blue bars, CR; red bars, HR; green bars, FD), named xx-MY, xx: trait acronym. Solid bars denote the most probable position of the QTL obtained from the highest LOD score position given by the MIM and the bootstrap (1000 permutations). Confidence intervals (α <5%) are represented as lines. Distance between markers is represented in cM. Markers present in both families are in bold, italic and underline.







R×G	GL	QTL	L(cM)	IC (95%)	LOD	VEmax	dmax
Année simple							
2008	R7	FDR7-08_1	6,9	[3.54;10.32]	10,5	19,4	-4,3
		FDR7-08_2	19,6	[11.3;27.9]			3,6
2009	R6	FDR6-09_1	33,2	[2.3;64.0]	14,0	15,4	-1,0
		FDR6-09_2	78,0	[72.9;81.7]			-1,9
	R7	FDR7-09_1	7,9	[1.57;14.14]	12,5	16,5	-2,3
		FDR7-09_2	34,1	[21.2;47.0]			2,4
2010	R7	FDR7-09_1	7,0	[1.06;12.98]	11,8	16,7	-1,0
		FDR7-09_2	45,3	[26.0;57.6]			1,1
2011	R7	FDR7-09_1	7,0	[0.83;13.23]	5,4	14,6	-1,9
		FDR7-09_2	24,2	[14.4;34.1]			1,7
	G3	HRG3-11_1	39,1	[25.1;53.0]	6,1	12,7	-240,4
		HRG3-11_2	82,8	[53.9;100.3]			247,0
2012	G5	CRG5-12_1	19,9	[17.8;22.1]	8,2	27,3	-7,6
		CRG5-12_2	40,2	[34.4;45.9]			6,4
Multi-année							
	R4	CRR4-MY_1	21,4	[14.7;28.1]	25,9	27,0	6,7
		CRR4-MY_2	49,8	[33.1;59.9]			-2,8
	R7	FDR7-MY_1	5,9	[4.77;6.99]	48,2	14,7	-1,9
		FDR7-MY_2	29,8	[26.9;32.7]			1,8
	G5	CRG5-MY_1	19,4	[14.7;24.2]	12,0	26,3	-6,8
		CRG5-MY_2	41,2	[34.0;48.3]			6,6
		FDG5-MY_1	18,6	[12.2;25.0]	19,0	13,3	-1,5
		FDG5-MY_2	49,2	[40.7;57.7]			1,7

Tableau 10. Détection « 2QTL » pour les besoins en froid (CR), les besoins en chaud (HR) et la date de floraison (FD) dans la descendance R×G.

GL, groupe de liaison; L, distance entre le début du GL et le point avec le plus fort LOD en centimorgan; IC, intervalle de confiance; LOD, logarithm of the odds ratio; VE, variation expliquée par le QTL en pourcentage; d: différence X(A)-X(B) selon l'année d'évaluation, où A et B sont les deux marqueurs homozygotes; (+/-): le signe varie en fonction de l'année de l'évaluation

I.3. Résultats complémentaires

Une analyse QTL permettant de détecter deux QTL sur un même groupe de liaison a été réalisée à l'aide du logiciel MultiQTL. Les hypothèses suivantes sont testées par 1000 permutations : H2, présence de deux QTL, contre les hypothèses H1, présence d'un seul QTL, et H0, absence de QTL. Afin d'être certain de la validité de ces deux QTL situés sur le même groupe de liaison, nous avons vérifié que leur effet de substitution allélique était significativement différent de zéro.

Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence de deux QTL sur les groupes de liaison 3, 4, 5, 6 et 7, uniquement dans la famille R×G. (**Tableau 10**)

Pour le groupe de liaison 7, les deux QTL impliqués dans la date de floraison de 'Regina' sont détectés pour les années 2008, 2009, 2010 et 2011.. Ces deux QTL expliquent de 5% à 14% de la variation suivant les années. L'analyse multi-année montre deux QTL avec des intervalles de confiance de petites tailles (2,2 et 5,8 cM). Ces deux QTL pourraient expliquer le changement de position observé lors de l'analyse 1 QTL (**Tableau 10**).

Pour le groupe de liaison 5 du parent 'Garnet', deux QTL seraient impliqués et expliqueraient 27% dans la variation des besoins en froid en 2012. Avec l'analyse multi-année, on retrouve ces deux QTL qui co-localisent avec les deux QTL impliqués dans la date de floraison expliquant 12% de la variation de ce caractère.
II. Déterminisme moléculaire de la floraison chez le cerisier II.1. Introduction

Afin d'identifier les gènes fonctionnels impliqués dans la floraison du cerisier doux, une recherche bibliographie a été réalisée sur la plante modèle *Arabidopsis* ainsi que chez d'autres espèces végétales pérennes telles que le peuplier, le pêcher, ou encore le cassissier (*Ribes nigrum* L.). De cette étude, près de 200 gènes ayant un rôle plus ou moins direct dans la floraison ont été identifiés (**Annexe 3**). A partir de ces gènes, une recherche des séquences homologues chez le cerisier a été réalisée à partir de l'unigène cerisier de la variété 'Regina'. Sur la totalité des gènes identifiés dans la littérature, des séquences homologues chez le cerisier nu 175 gènes candidats. En parallèle, les séquences homologues chez le pêcher ont été identifiées pour tous ces gènes candidats dans le but d'identifier les parties introniques de ces gènes. Cette analyse n'a pas permis de mettre en évidence des homologues spécifiques au cerisier.

Parmi ces 175 gènes candidats fonctionnels, 79 ont été sélectionnés pour ce travail de thèse (**Tableau Publication 2-Table S3**). Cette sélection ne comprend que les gènes candidats ayant une séquence homologue unique et exclut une grande partie des gènes appartenant à des familles multigéniques.

L'analyse de ces 79 gènes est présentée dans la publication suivante (**Publication 2**), actuellement en cours de finalisation :

Castède S, Campoy JA, Wenden B, Le Dantec L, Barreneche T, García JQ, Dirlewanger E. 2014. Mapping and expression analyses of candidate genes involved in Ssweet cherry (*Prunus avium*) flowering time. *BMC plant biology*.

II.2. Publication 2

Mapping and expression analyses of candidate genes involved in sweet cherry (Prunus avium) flowering time

Sophie Castède^{1,2}, José Antonio Campoy^{1,2}, Bénédicte Wenden^{1,2}, Loïck Le Dantec^{1,2}, Teresa Barreneche^{1,2}, José Quero-García^{1,2}, Elisabeth Dirlewanger^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

²INRA, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Author for correspondence: Dirlewanger Elisabeth Tel: 33 5 57 12 24 61 Email: <u>dirlewan@bordeaux.inra.fr</u>

Abstract

Background: The timing of flowering in perennial plants is crucial for their survival in temperate climates and is conditioned by the duration of bud dormancy. Bud dormancy release and bud break depend on the perception of cumulative chilling during endodormancy and heat during the bud development. The objectives of this work were to identify candidate genes (CGs) involved in dormancy and flowering processes in sweet cherry, their mapping in two mapping progenies, the selection of those co-localized with quantitative trait loci (QTLs) associated with temperature requirements for bud dormancy release and flowering, for a further expressional analysis during the dormancy period.

Results: From a list of 79 CGs, 35 were genetically mapped in at least one of the two progenies and nine, not polymorphic, were *in silico* mapped. In total, 25 CGs co-localized with QTLs of interest. The expression of four CGs located within the QTL with major effect on flowering date on linkage group 4 showed constant and low level of transcripts with no significant difference between early and late blooming varities. The two *DORMANCY ASSOCIATED MADS-box* genes (*DAM 5/6*) within the QTL in linkage group 1 and the *SHORT VEGETATIVE PHASE* in linkage group 6 were all down regulated over dormancy release but with no difference between varieties. On linkage group 6, *FLOWERING LOCUS T* expression was increased during endodormancy followed by a down-regulation towards flowering. However, no significant differences in the expression of any of the CG studied were found among the studied cultivars while their CR covered the range of variability of this species.

Conclusions: Co-localization between CGs and QTLs associated with temperature requirements and flowering date were identified for the first time in sweet cherry. The expression analyses of the analyzed CGs suggest a complex flowering regulation as already reported in other perennials. A better understanding of the genetic and epigenetic regulation of flowering may help breeders to select new varieties adapted to further climatic conditions.

Keywords: candidate genes, chilling requirements, expressional analyses, flowering date, heat requirements, phenology, *Prunus avium*, quantitative trait loci

Background

The life cycle of plants is complex, especially for perennial species with repeating cycles under contrasting environments. This is particularly true for flowering that is one of the most fundamental and complex developmental processes and needs to be synchronized with climatic conditions especially in temperate regions with alternating well-differentiated seasons. As flowering is crucial for survival, buds of perennial species in temperate regions cease growth and become dormant during part of autumn and winter to protect important and delicate tissues from low winter temperatures (Cooke et al., 2012). This transitional dormancy period is described by Lang (1987) in three characteristic phases, paradormancy, endodormancy and ecodormancy. In paradormancy, internal signals inhibit bud growth during the growing seasonal. In autumn and winter, endodormancy prevents bud growth and requires a certain amount of chilling to make transition to ecodormancy (chilling requirements), in which buds can resume growth when environmental conditions are favourable. Following the endodormancy stage, buds are ecodormant and require a certain amount of heat to allow the flowering process to start (heat requirements). Consequently, dormancy and flowering are linked in perennial species and their proper timing determines the efficiency of the process and the productivity for fruit species.

Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms controlling dormancy and flowering in perennials reported that bud dormancy is dynamic rather than a single state, with interactions between intrinsic and environmental signaling cues altering the depth of dormancy (Arumuganathan & Earle, 1991; Cooke *et al.*, 2012). Thus, changes in the environmental signaling, may affect the dormancy cycle and, consequently, the overall plant phenology. Several studies have reported the effect of global warming over winter chilling accumulation of temperate perennial crops during the last century (Knott, 1934; Potter *et al.*, 2007) and predicted an upcoming substantial decrease of the production in different perennial crop producing areas (Potter *et al.*, 2007; Albani & Coupland, 2010). Insufficient chill can cause problems related to flower bud abscission and quality, fruit set and quality and vegetative growth and development (Lee *et al.*, 2000; Campoy *et al.*, 2011a), whereas in cold areas, the increase in temperatures may result in a substantially increased spring frost risk (Jang *et al.*, 2009).

The flowering process in perennial plants is different from that of annual plants, buddormancy release and reset being specific to the perennial. In trees, and fruit trees in particular, flower buds are differentiated in the year preceding the flowering date, but the precise timing for flowering is determined by the temperature response during the dormancy period. On the other hand, in some perennials and most annuals, floral induction and flowering occur during a unique growth cycle and are controlled by similar environmental and endogenous factors. Both in endodomancy and vernalization systems, flowering and flower induction respectively are promoted after plants have been exposed to a certain amount of cold temperature, suggesting similar response mechanisms. In the model plant Arabidopsis thaliana, as well as in many other annual plants like wheat and rice, analyses of genes involved in flowering processes led to four major pathways involved in environmental and endogenous signals transduction: vernalization, photoperiod, gibberellic acid, autonomous; and a large number of genes were identified to regulate flowering time (Mouradov et al., 2002; Amasino, 2010; Khan et al., 2014). In Arabidopsis thaliana, the MADS-box transcription factor FLOWERING LOCUS C (FLC) prevents the flowering transition by repressing the floral integrator genes FLOWERING LOCUS T (FT) and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1) (Searle et al., 2006). The expression of FLC is enhanced by a plant-specific protein encoded by FRIGIDA (FRI) (Michaels & Amasino, 1999). Vernalization overcomes the effect of FRI by repressing FLC expression by an epigenetic mechanism involving the synthesis of noncoding RNAs and the binding of the Polycomb group (PcG) proteins (De Lucia et al., 2008; Swiezewski et al., 2009; Heo & Sung, 2011). Among the PcG genes, those coding for the Polycomb repressive complexes 2 (PRC2) subunits, like CURLY LEAF (CLF), EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2) and FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE2), play a major role in the repression of FLC (Jiang et al., 2008). In cereals, vernalization is controlled by VERNALIZATION1 and 2 (VRN1, VRN2), which respond to cold by increasing their expression (Kurokura et al., 2013; Oliver et al., 2013).

Regarding perennial plants, bud dormancy and flowering has been extensively studied in poplar (*Populus ssp.*), the model woody plant, and a strong involvement of photoperiod, temperature and gibberellic acid were reported (Zhang *et al.*, 2010; Rinne *et al.*, 2011). However, alternative mechanisms of flowering regulation were reported in other woody perennials. In particular, dormancy release for several *Rosaceae* trees was shown to rely mainly on temperature sensing mechanisms (Heide & Prestrud, 2005; Heide, 2008) making them vulnerable to global warming. The flowering date was dissected into chilling and heat requirements in peach (Fan *et al.*, 2010), apricot (Olukolu *et al.*, 2009) and cherry (Castède *et al.*, 2014). In *Prunus*, studies suggest that chill requirement affects more strongly flowering date than heat requirement: sweet cherry (Alburquerque *et al.*, 2008; Castède *et al.*, 2014), apricot (*Prunus armeniaca* L.) (Campoy *et al.*, 2012), almond (*Prunus amygdalus* L. syn.

Prunus dulcis M.) (Sanchez-Perez et al., 2012), and peach (Prunus persica L.) (Okie & Blackburn, 2011). With the establishment of highly dense linkage maps (Klagges et al., 2013), substantial progress was made in identifying quantitative trait loci (QTL) dissecting flowering date into chilling and heat requirements in sweet cherry (Castède et al., 2014). QTL with major effect for chilling requirements and flowering date was found on linkage group (LG) 4 in sweet cherry (Castède et al., 2014). This result was in agreement with previous works in almond (Sanchez-Perez et al., 2012), apricot (Dirlewanger et al., 2012; Socquet-Juglard et al., 2013) and peach (Fan et al., 2010; Dirlewanger et al., 2012). Additionally, a QTL for flowering date co-localizing with the evergrowing (EVG) region was detected on LG1 in peach (Fan et al., 2010) and sweet cherry (Castède et al., 2014). In peach, six tandemly repeated MADS-box genes, named DORMANCY ASSOCIATED MADS-box1-6 (DAM1-6) genes, were located in the EVG region and two of them (DAM5 and DAM6) were reported to be the strongest candidate genes (CGs) for the major QTL for chilling requirements at the lower end of LG1 (Bielenberg et al., 2008; Jimenez et al., 2012; Zhebentyayeva et al., 2014). These genes are not expressed in the peach mutant every which fails to both cease growth and enter dormancy under dormancy-inducing conditions (Jimenez et al., 2009). More recently, histone modifications in DAM6 gene were investigated and results suggested the role of epigenetic mechanisms in DAM6 regulation and bud dormancy release (Leida et al., 2012b). Modification of DAM6 chromatin in a similar way to FLC, as a consequence of the prolonged exposure to low temperatures (Bastow et al., 2004), suggests the existence of mechanistic similarities between vernalization and bud dormancy processes. Several additional genes were also reported to play an important role in dormancy process in Rosaceae species. In Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.) and in raspberry (Rubus idaeus L.) the SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) genes are down regulated during dormancy release (Yamane et al., 2008). All these results suggest a complex genetic and molecular determinism of dormancy and flowering processes.

Following our work that led to the identification of QTLs for flowering, chilling and heat requirements in sweet cherry (Castède *et al.*, 2014), we aimed to further investigate these traits and the genes and pathway potentially involved. The main objectives of this work were to identify and study genes involved in the flowering processes, and thus to explain flowering date variations observed between sweet cherry genotypes. Thus, genes known to be involved in flowering processes in model (*Arabidopsis* and poplar) and related species (peach and blackcurrant) were selected. These genes were then mapped in two sweet cherry mapping progenies and those that co-localized with flowering date QTLs already identified in these progenies were selected and analyzed at the transcriptional level during the dormancy period.



Fig. 1. Co-localization between candidate genes (CGs) mapped and Quantitative Trait Loci (QTLs). QTLs detected in 'Regina' \times 'Garnet' (R \times G) (left) and 'Regina' \times 'Lapins' (R \times L) (right) progenies are indicated by grey bars for chilling requirements (CR), white bars for heat requirements (HR), and black bars for flowering date (FD). On the left, CGs mapped on R \times G and on the right, those mapped on R \times L. In box, genes co-localized with major QTLs on linkage group (LG) 1, 4 and 6. Underlined genes are involved in dormancy process while those in bold are involved in temperature. Mapped CGs were named preceded by the prefix "Pav", in silico mapped CGs on the peach genome v1.0 are preceded by the prefix "is".

This work provides further information on genetic and molecular determinism of flowering phenology and its findings will help cherry breeders to implement efficient strategies focused on the adaptation to future climatic conditions.

Results

Positioning of CGs within QTL intervals

A list of 79 functional CGs was established based on data available on flowering processes in *Arabidopsis thaliana* and other plant species including poplar (*Populus* ssp.), peach (*Prunus persica* L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) (Table S3). Among these 79 genes, 20 were involved in photoperiod pathway, 25 in temperature pathway, 14 in dormancy processes, six in gibberellin pathway, two in autonomous pathway and three were floral integrators. Following this selection, both peach and sweet cherry homologous sequences were identified for each gene.

To determine if the CGs were located within QTLs involved in chill requirements, heat requirements or flowering date in the sweet cherry genetic map (Castède et al., 2014), they were mapped using single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified on sweet cherry homologous sequences. This study was initiated by amplifying the sequences, which were obtained for 77 genes, 70 of them with a single amplified fragment (Table S3). Seven genes (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 (PRR7, PRR9), EARLY FLOWERING 7 (ELF7), SET DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (SDG2), ABA HYPERSENSITIVE 1 (ABH1), RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6), SET DOMAIN GROUP 26 (SDG26) for which multiple amplifications were obtained, probably due to multigenic families, were not analyzed in this work. For 40 genes out of the 70 amplified sequences, at least one SNP was detected (Table S3); 28 SNPs were found in intronic regions (within 26 genes), 13 in exons and one in 5'UTR region. Twenty eight (68%) were transitions (19 were C/T polymorphism while 9 were A/G polymorphism) and 13 (32%) were transversions (5 A/T, 3 G/T, 3 C/G, 2 A/C). The proportions of transitions versus tranversions in exonic and intronic regions were 65 and 71 %, respectively. Three genes (ortologous of HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), VARIANT IN METHYLATION 1 (VIM1) and VRN2) were mapped on 'Regina' \times 'Lapins' (R \times L) but could not be mapped in 'Regina' \times 'Garnet' (R \times G) progeny and five genes (FAR1-RELATED SEQUENCE 5 (FRS5), FIONA1 (FIO1), VIN3-LIKE 1 (VIL1), GLYCOSYL HYDROLASES17-39 and 101 (GH17-39, GH17-101)) could not be mapped at all for technical reasons. In total, based on identified SNPs, 35 CGs were mapped and were found to be distributed on all linkage groups (LG) (Figure 1). They were all located



Fig. 2. Expression pattern of candidate genes co-localized with highest effect QTL on LG4 in floral buds throughout dormancy: ARP4, EMF2, NUA and PIE1. Transcript levels of candidate genes was determined by quantitative PCR with specific primers from samples of 'Cristobalina' (C), 'Garnet' (G), 'Lapins' (L) and 'Regina' (R) floral bud tissues from October to March. The names of genes are indicated in the left of the graph. Only the data normalized against ACTIN (ACT) are shown.. Values are means of two biological replicates with three technical repeats each. Bars indicate the range of expression. Endodormancy release dates are indicated for each parent by an arrow on the top. Grey arrow shows the extrapolation of endodormancy release for 'Cristobalina'.

in sweet cherry in syntenic regions as the same genes in peach, except one, homologous of SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE 3 (SAR3), mapped on LG8 in sweet cherry while it is located on LG2 in peach. Twenty nine genes could not be mapped because no polymorphic SNP was detected. Among them, nine were located in peach in the homologous region of the major QTLs for flowering date, chill and heat requirements, in LG1, LG4 and LG6 (Castède et al., 2014), and were homologs of genes involved in the response to environmental conditions, hence of high interest for this study: *DAM5* and *DAM6* involved in the control of dormancy release, *GIBBERELLIN 2-OXIDASE (GA2OX), GIBBERELLIN 20-OXIDASE (GA2OOX)* and *KAURENE SYNTHASE* genes (*KS, KSb, KSc*) involved in gibberellin pathways, *FT* floral integrator and *PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1)* components of SWR1 complex. Subsequently, they were localized *in silico* using the peach genome (Table S3, Figure 1 and S1), based on the high synteny within the *Prunus* genus (Dirlewanger *et al.*, 2004b; Klagges *et al.*, 2013).

In total, 25 CGs co-localized with QTLs of interest, 16 CGs being genetically mapped and 9 being *in silico* mapped. Among them, nine CGs co-localized with the QTL showing the highest effect for flowering date on LG4 of 'Regina' (Castède *et al.*, 2014): ACTIN-RELATED PROTEIN 4 (ARP4), EMF2, NUCLEAR PORE ANCHOR (NUA) and PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1) involved in temperature pathways and KS, KSb, KSc, GA20OX, GA2OX, involved in the gibberellins pathway. Seven CGs co-localized with QTLs on LG1 and three of them co-localized with the QTL for flowering date on the LG1 of 'Lapins', at the same location as the peach evergrowing locus: HYL1, DAM5 and DAM6. LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) was localized in a LG2 QTL; VRN2 and DWARF AND DELAYED FLOWERING 1 (DDF1) co-localized with QTL for flowering date on LG5 of 'Regina'; SVP and FT co-localized with QTLs on LG6; CLF on LG7 QTL; GIGANTEA (GI), SWINGER (SWN) and SAR3 on LG8 QTL.

CG expressional analyses

The potential role of the identified CGs in flowering time was evaluated by comparing their expression patterns in floral buds over the dormancy period in four sweet cherry cultivars with contrasted chilling requirements and dates of flowering.

Analyses first focused on the nine CGs co-localizing with the highest effect QTL on LG4 of 'Regina' (Figure 1). These CGs are involved in temperature reponse pathway (*EMF2*, *NUA* and *PIE1*), in gibberellic acid pathway (*GA2ox*, *GA20ox*, *KS*, *KS_b* and *KS_c*) and one cellular factor indirectly involved in temperature pathways (*ARP4*). The high conservation between the *KS* genes and within the *GIBBERELLIN OXIDASE* gene family caused difficulties to



Fig. 3. Expression of candidate genes co-localized with major effect QTL in floral buds throughout dormancy: SVP, DAM5 and DAM6. DAM genes are located in the QTL on the LG1 and SVP in the QTL on LG6. Transcript levels of candidate genes was determined by quantitative PCR with specific primers from samples of 'Cristobalina' (C), 'Garnet' (G), 'Lapins' (L) and 'Regina' (R) floral bud tissues from October to March. The names of genes are indicated in the left of the graph. Only the data normalized against ACTIN (ACT) are shown. Values are means of two biological replicates with three technical repeats each. Bars indicate the range of expression. Endodormancy release dates are indicated for each parent by an arrow. Grey arrow shows the extrapolation of endodormancy release for 'Cristobalina'.

obtain specific primers for these genes and they were not analyzed. Expression profiles for the remaining genes, *ARP4*, *EMF2*, *NUA* and *PIE1* did not display a distinctive pattern of expression (Figure 2). For *EMF2* and *PIE1*, transcript levels were low and stable during the dormancy and there were no significant variations between cultivars. However, a small increase of expression was observed early in 'Cristobalina' and late in 'Regina' for *ARP4*, putatively related to their contrasted dormancy release dates (Figure 2). Such a slight pattern was also visible for *NUA*, with expression peaks during early February for 'Lapins' and 'Garnet', and a later peak for 'Regina' at the end of February.

DAM and *SVP* genes were shown to be key players in the release of dormancy, and in the control of flowering time in several Rosaceae species. Consequently, we investigated the potential role of sweet cherry *DAM5*, *DAM6* in dormancy and flowering. *DAM5* and *DAM6* are co-localized with a QTL for flowering date on LG1 of 'Lapins' (Figure 1). *SVP* co-localized with a QTL for flowering date on LG6 of 'Regina' (Figure 1). Expression profiles were analyzed for these genes in dormant floral buds in the four cultivars (Figure 3). Results strongly suggest that these genes are somehow involved in dormancy as they were all down regulated over dormancy release (Figure 3). However, observations indicated no significant difference in the expression profiles between genotypes, suggesting that these genes might not be involved in the genetic variability for flowering date and chilling requirements.

Since FT is a major gene involved in flower initiation but also in dormancy regulation in several perennials, we investigated its expression pattern over the dormancy period (Figure 4). For the four genotypes, results showed an overall up regulation of FT expression between October and January, which corresponds to endodormancy, followed by a down regulation towards flowering. In particular, the decrease in expression started in January for 'Cristobalina' and 'Lapins' whereas transcripts were accumulated more slowly until February before decreasing for 'Garnet' and 'Regina'. This could be linked to flowering dates since 'Cristobalina' is characterized by a very early flowering date in contrast to 'Regina'. However, the differences in FT expression observed between 'Garnet' and 'Lapins' cannot be correlated to flowering dates as they display a similar phenotype.



Fig. 4. Expression of the candidate gene FT co-localized with major QTL on LG6 in floral buds throughout dormancy. Transcript levels of candidate genes was determined by quantitative PCR with specific primers from samples of 'Cristobalina' (C), 'Garnet' (G), 'Lapins' (L) and 'Regina' (R) floral bud tissues from October to March. The names of genes are indicated in the left of the graph. Only the data normalized against ACTIN (ACT) are shown. Values are means of two biological replicates with three technical repeats each. Bars indicate the range of expression. Endodormancy release dates are indicated for each parent by an arrow on the top. Grey arrow shows the extrapolation of endodormancy release for 'Cristobalina'.

Discussion

Data on the molecular and genetic control of flowering are scarce in sweet cherry. Consequently, we investigated CGs based on homology with genes involved in flowering processes in model plant species such as *Arabidopsis thaliana*, *Populus*, and *Prunus persica*. Starting from a wide list of CGs, we identified and studied homologs in sweet cherry and we were able to colocalize a subset of these genes with QTLs for flowering time and chill and heat requirements. Ultimately, the most promising genes, involved in diverse processes related to flowering, including epigenetic mechanisms and dormancy, were further studied. Their expression patterns were analyzed over the dormancy period in four varieties, contrasted for their chill requirements and flowering time.

Candidate genes identification and mapping

Among the 79 CGs analyzed, single amplified fragment were obtained for 70 CGs, 40 of them including at least one SNP. Most of the SNPs (~60%) were found in intronic regions, showing the expected higher variability compared to exonic regions.

Thirty four CGs, among the 35 mapped CGs, colocalized with peach homologues confirming the high synteny between sweet cherry and peach. In addition, these results give a good feedback regarding the synteny for the *in silico* mapped CGs, for which no SNPs were detected in the parents of the mapping populations. *SAR3* was the only gene that was not mapped in the same LG in cherry (LG8) and in peach (LG2), which may suggest that this gene is present in several copies and the polymorphism was detected only in one locus.

A total of nine CGs co-localized with the major QTL on LG4, possibly explaining a mean value of 36.3% of the phenotypic variation of flowering date (Castède et al., 2014). These genes are homologs of genes known to be involved in the temperature pathway (ARP4, EMF2, NUA and PIE1) and gibberellins pathway (KS, KSb, KSc, GA200X and GA2OX). No CG of the photoperiod pathway was found in this major QTL, which might suggest that photoperiod has few or no effect on flowering time in sweet cherry as it was already reported in several genus of the Rosaceae family: Malus, Pyrus and Sorbus (Heide & Prestrud, 2005; Lafon-Placette *et al.*, 2013). However, Heide (2008)showed a pronounced photoperiod/temperature interaction in the control of growth cessation and resumption in several Prunus including P. avium. The lack of CG associated to the photoperiod pathway may be also due to the absence of genetic variation for those hypothetical CGs within the parents used in the crosses. At the bottom of LG1, three CGs (DAM5, DAM6 and HYL1) colocalized with the second most important QTL for flowering date found for the R×L mapping

progeny, explaining 8 % of the variation of this trait. This region is the same as the EVG peach region suggesting a common genetic control between these two Prunus species.

A putative role for epigenetic mechanisms in the control of flowering time

ARP4, EMF2, and PIE1 are homologs of genes involved in the temperature pathway in Arabidopsis and they were all found to be located on the major QTL for chilling and heat requirement and flowering date in LG4. In Arabidopsis thaliana, AtARP4, AtARP6 and AtPIE1, were reported to be required for the deposition of the histone variant H2A.Z into chromatin at multiple loci, including the AtFLC gene (Deal et al., 2007; Kim et al., 2009a). H2A.Z has been implicated in numerous chromatin-mediated processes, including transcriptional activation, euchromatin maintenance, and heterochromatin formation (Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). In addition, the EMF2 subunit of the PRC2 complex, is known to repress the expression of AtFLC (Jiang et al., 2008) and PRC2 plays a prominent role in establishing an epigenetic cellular memory during the vernalization response (Alexandre & Hennig, 2008). In sweet cherry, epigenetic regulation of flowering time might occur through the control of bud dormancy. Recent findings strongly suggest the participation of different epigenetic mechanisms involving histone modification, DNA methylation and small non-coding RNAs in the regulation of bud dormancy events (Ríos et al., 2014). Accordingly, the colocalization of these key genes, thought to be involved in epigenetic processes, with a QTL of high effect for flowering time in sweet cherry might suggest a role for epigenetic mechanisms. However, no significant differences in the expression level were detected during all the analyzed period covering the endodormancy until the beginning of flowering. Moreover, no differences were observed between the four analyzed varieties 'Cristobalina', 'Regina', 'Garnet', 'Lapins' although they differ from more than 30 days for flowering date between the earliest 'Cristobalina' and the latest 'Regina'. A small early peak of expression was visible in 'Cristobalina' at the beginning of January, compared to a later peak of expression in 'Regina'. However, differences were scarcely significant so further analyses are required in order to confirm these observations. In Arabidopsis thaliana, Atarp4 mutation, or even a partial disruption of AtARP4 seem to have drastic effects on the development of the plant (Kandasamy et al., 2005). This may support the fact of not observing high differences in ARP4 expression between the four varieties. This is also true for EMF2 and PIE1, which are involved in key epigenetic mechanisms. However, further analyses will be required to study polymorphisms in sequences for those genes between the varieties, since protein variants, rather than different expression levels, could be responsible for the observed differences in flowering dates.

Validation of the involvement of DAM/SVP genes over dormancy

Identified in the region of the evg locus, DAM genes have been proposed as regulators of developmental processes in peach, including seasonal elongation cessation, terminal bud formation (Li et al., 2009) and especially dormancy (Jimenez et al., 2010). In particular, DAM5 and DAM6 were shown to be strongly regulated by exposure to chilling temperatures over the dormancy period (Jimenez et al., 2010). These two genes were also characterized for their different seasonal expression patterns between peach cultivars with different CRs (Yamane et al., 2011), thus validating their key role in the genetic variability for the molecular control of dormancy response. In order to confirm a similar role for DAM genes in sweet cherry, we tested the expression of sweet cherry homologues of DAM5 and DAM6, together with SVP that belongs to the same MADS-box genes family, over the dormancy period. Results confirmed that they were all progressively down-regulated from the beginning of the endodormancy period until the endodormancy release, critical stage at which they are then totally repressed. A significant reduction of transcripts levels was found along chilling accumulation until mid-December in accordance with the previous results in peach (Li et al., 2009; Jimenez et al., 2010). The expression levels of DAM5 and DAM6 reached a minimum in each sweet cherry cultivar at the endodormancy release period, as previously found in vegetative and flower buds in peach (Jimenez et al., 2010; Leida et al., 2010; Yamane et al., 2011). Observation of SVP down-regulation in response to cold is in agreement with results obtained from various perennials during endodormancy release including Japanese apricot (Yamane et al., 2008), raspberry (Rubus idaeus L.) (Mazzitelli et al., 2007) and kiwifruit (Wu et al., 2012). However, unlike for peach (Jimenez et al., 2010; Leida et al., 2010) and Japanese apricot (Ratcliffe et al., 2001; Ratcliffe et al., 2003; Sasaki et al., 2011), no significant differences in the expression of DAM5 and DAM6 between high and low chill cultivars were found in sweet cherry. In addition, while in peach DAM5 and DAM6 are located at the major QTL for flowering and CR in LG1 (Fan et al., 2010; Zhebentyayeva et al., 2014), DAM5 and DAM6 did not colocalize with the major effect QTL in sweet cherry, located in LG4. These results suggest that DAM5 and DAM6 may not play a key role in the genetic variability for dormancy and chill requirements in sweet cherry. However, as we currently lack information on sequence variation in the transcribed regions that could impact protein function or alternative splicing that could account for the differences between cultivars, further studies on sequence polymorphisms or splicing of DAM5 and DAM6 should be performed to validate the hypothesis that these genes are not involved in the genetic response to cold during dormancy.

A potential contribution of NUA in dormancy release and flowering time

NUA is the Arabidopsis thaliana homologue of the vertebrate TRANSLOCATED PROMOTER REGION (TPR), and appears to be one of the few nuclear pore proteins conserved between animals, yeast and plants. Mutations of NUA have been associated with early flowering under short days and long days and altered expression of several flowering regulators such as FLC, FT and SOC1 (Xu et al., 2007b). In particular, this nucleoporin was shown to be involved with mRNA export. During dormancy release, the whole metabolic and molecular machinery is activated and we can hypothesize that nucleoporins, and NUA in particular might be essential to control RNA regulation. Weak variations in NUA expression were observed over time and between contrasted varieties, which suggest that further investigation is necessary to better understand the role of NUA in flowering and dormancy processes in sweet cherry.

A possible different role of FT in sweet cherry compared to *Populus*?

The key role of FT genes in flowering and dormancy processes has been investigated in various perennial species. In poplar, FT1 and FT2 were shown to act in reproductive and vegetative growth, including growth cessation and flower initiation, through their transient expression in contrasting seasons (Hsu et al., 2011). The conservation of FT function was confirmed by overexpressing *Populus FT1* in plum trees, which reduced the generation time and rendered them unable to enter dormancy (Srinivasan et al., 2012). In peach and sweet cherry, only one FT homologue could be identified and we investigated its expression throughout dormancy. Results indicated that FT was upregulated from the beginning of endodormancy toward dormancy release (October-January), followed by a down regulation until flowering. This expression pattern was similar for the four genotypes. Such an increase in expression during the winter period was also observed for FT1 in Poplar (Hsu et al., 2011), associated with flower initiation. However, in sweet cherry, floral induction and initiation are thought to happen in late spring and summer much later than the winter peak. In addition, the decrease in transcript levels appears earlier in 'Cristobalina' and 'Lapins', compared to 'Garnet' and 'Regina'. Although 'Cristobalina' is a very early flowering variety and 'Regina' is characterized by late flowering, results for 'Lapins' and 'Garnet' prevent us from suggesting a possible link between FT and flowering. Further analyses are needed to better understand the role of FT in developmental processes in sweet cherry.

Conclusions

In this study we show the first co-localization between QTLs associated with temperature requirements and flowering date with CGs in sweet cherry. The colocalization of CGs involved in epigenetic mechanism with a QTL with major effect on LG4 may suggest the putative role of epigenetics in the control of dormancy and flowering time in sweet cherry. Besides, our results confirm the down-regulation of DAM genes, located on LG4 during dormancy release in sweet cherry, although no expressional differences between low and high chill cultivars were found.

As already reported in other perennials, the expression analyses of the analyzed CGs suggest a complex regulation of dormancy and flowering processes. Further analyses are necessary to provide new understanding of the complex process involved in dormancy release and flowering time control. A better understanding of the genetic and epigenetic regulation of flowering may help breeders to select new varieties adapted to further climatic conditions.

Methods

Plant material

Two intraspecific sweet cherry F1 progenies and their parents were used for genetic analyses. One progeny of 124 individuals derived from a cross between a German variety, 'Regina' and an American variety 'Lapins', called R×L. The other progeny of 117 individuals was issued

from a cross between the variety 'Regina' and an American variety 'Garnet', called R×G. In this work, selected varieties, 'Cristobalina', 'Garnet', 'Lapins' and 'Regina' differ for traits involved in flowering phenology. 'Cristobalina' is one of the earliest flowering varieties and was used for expression analyses, 'Lapins' and 'Garnet' are considered as early flowering varieties (before reference cultivar 'Burlat') and 'Regina' displays a late flowering phenotype (after 'Burlat').

All trees were cultivated in the experimental orchard of INRA-Bordeaux research center located at Toulenne, near Bordeaux, France. The trees were grown on their own roots, on deep loamy soil on the bank of Garonne River at 15 m above sea level, lat. 44.57 N, long. 0.28 W, in a mild winter area with a yearly average rainfall of 825 mm.

 $R \times L$ and $R \times G$ mapping progenies were previously used for a QTL detection study on the three traits chill requirements, heat requirements and flowering date (Castède *et al.*, 2014). Cristobalina were used only in expression analyses.

Bud sampling and evaluation of dormancy release

For gene expression analyses, branches of 'Regina', 'Garnet', 'Lapins' and 'Cristobalina' varieties were collected in the morning every ten chill portions [Dynamic model (Fishman et al., 1987), from October 13th until flowering (Table S1)]. For each branch, 3 g of floral buds were collected, manually scaled and frozen with liquid nitrogen. Each sample was grounded into a fine powder in the liquid nitrogen and stored at -80°C.

For evaluation of dormancy release, three branches of 'Regina', 'Garnet' and 'Lapins' were sampled. Dormancy release was evaluated following a forcing protocol widely used in temperate fruit trees, as described in Castède et al. (2014). For 'Cristobalina', dormancy release was estimated based on previous data (Alburquerque et al., 2008).

Nucleic acid isolation

DNA extraction

For genotyping, young leaves were collected from 'Regina', 'Garnet', 'Lapins' and for all individuals of both progenies. Samples were frozen with liquid nitrogen, grounded into a fine powder and stored at -80°C. DNA extraction was realized from 100 mg of frozen leaves

powder, with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following manufacturing instructions and stored at -20°C.

RNA extraction and reverse transcription

For transcript levels analyses, total RNA was extracted from 100 mg of frozen floral bud powder using a modified CTAB method (Tong et al., 2012) replacing phenol by 2% betamercaptoethanol. RNA purification and DNase treatment was realized using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). RNA quality was evaluated on agarose gel and concentration was assessed with Nanodrop® (ref). 1 μ g of total RNA was reverse transcribed with IScriptTM cDNA Synthesis Kit (Qiagen) in a final volume of 20 μ l. cDNA were diluted 50X and stored at -80°C.

CGs selection and mapping

Selection of CGs

CGs involved in flowering processes were selected from public databases: the Genomic Database for Rosaceae (GDR, http://www.rosaceae.org/), The Arabidopsis Information Resource (TAIR, http://arabidopsis.org/) and GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). For each gene selected in Arabidopsis thaliana and other plant species, peach and sweet cherry homologues were identified in the GDR and the sweet cherry Regina transcriptome database (lipm-fatal.toulouse.inra.fr/cgi/PRUAV.cgi), respectively, using nucleotide - nucleotide BLAST (BLASTN) with E value \leq 10-5. To identify SNPs, attention was given to non-coding regions (intron) where polymorphisms occur more frequently than in coding regions. In order to optimize the detection of polymorphism necessary form CG mapping, intronic regions were identified by comparing sweet cherry transcript homologues with the peach genome. Sequence alignments were visualized using the software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Primers were designed to amplify at least one intronic region using the software online Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/) (Table S2). PCR amplifications were performed in a final volume of 36 µl including 0.2 µM of each primer, 200 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl2, 10 ng of DNA of each parent and 0.4 U Taq polymerase (Invitrogen). PCR products were controlled on agarose gel and sent for sequencing to GENOME Express (http://www.beckmangenomics.com/). Heterozygous SNPs in each parent ('Garnet', 'Lapins' and 'Regina') were identified by visual inspection of DNA sequence chromatogram (BioEdit Sequence Alignment Editor).

CGs mapping

In order to map the CGs, heterozygous SNPs are required for at least one of the parents. Sequences of minimum 50 bp up and downstream from the SNP were used for primer design using Sequenom MassARRAY Assay Design 3.1 software with default parameters (Table S3). The genotyping for the two progenies and their parents was performed according to the iPLEX protocol from Sequenom (http://www.sequenom.com/Home) using the MassARRAY Analyzer 4 System (Sequenom, San Diego, USA) at the Genomic and Sequencing Facility of Bordeaux, France. Data were analyzed with Typer4 software (Sequenom, San Diego, USA). The CGs were then mapped on the available linkage maps constructed for the two progenies R×L and R×G (Klagges et al., 2013; Castède et al., 2014) using JoinMap® 4.0 (van Ooijen, 2006). The graphical presentation of linkage maps was performed using the MapChart software version 2.2 (Voorrips, 2002).

Transcriptional analysis of CGs

For transcript analysis, specific primers were designed using Primer3Plus (Table S2). 3 µl of cDNA were used for Quantitative PCR (qPCR) in a final volume of 10µl. Experiments were performed with LightCycler® 480 PCR Master SYBR Green according to manufacturing instructions on thermo-cycler Light Cycler® 480 instrument II (Applied Biosystems, USA) and with the following program: 10 min at 95°C and 45 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 57°C and 20s at 72°C. For each sample, two biological replicates and three technical repeats were analyzed. The relative expression level for each target gene was calculated as described in Pfaffl (2001), using *ACTIN (ACT)* and *RNA POLYMERASE II (RPII)* as reference genes and '2nd Derivative Max method' to determine the crossing point (CP) for each transcript (LightCycler® 480 Software 1.5.0, Roche Diagnostics). Results were similar for both reference genes and to simplify the graphic representation, we chose to present only the data obtained with *ACT*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SC, JAC and BW performed the sampling and the RNA extractions. SC carried out the search of CGs. SC and JAC carried out the genetic studies, the mapping of candidate genes and helped to draft the manuscript. SC carried out the expressional analysis supervised by BW. BW, JQG, LD and TB participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. ED conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the 'Conseil Regional d'Aquitaine' n°20111201001 and by INRA in the Meta Program ACCAF. We thank the technical team of laboratory and the Fruit Experimental Unit of INRA – Bordeaux for growing the trees. JA Campoy was holder of a postdoctoral fellowship from the 'Programa de Formación Postdoctoral de 'Personal Investigador' of the 'Fundación Séneca'—Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia', Spain.

Part of the experiments Sequenom and qPCR presented in the present publication were performed at the Genomic and Sequencing Facility of Bordeaux (grants from the 'Conseil Regional d'Aquitaine' n°20030304002FA and 20040305003FA and from the European Union, FEDER n°2003227 and from 'Investissements d'avenir, Convention attributive d'aide N°ANR-10-EQPX-16-01').
Supporting information

Supporting Tables

Table S1. Sampling details. In grey, samplings performed after endodormancy release.

		Si	weet Cherry v	ariety	
sampling date	chill portions	'Cristobalina'	'Garnet'	'Lapins'	'Regina'
13/10/2011	1.79	C1	G1	L1	R1
23/11/2011	12.55	C3	G3	L3	R3
09/12/2011	24.52	C6	G6	L6	R6
23/12/2011	35.49	C8	G8	L8	R8
09/01/2012	46.71	C10	G10	L10	R10
27/01/2012	58.62	C13	G13	L13	R13
14/02/2012	67.26	C15	G15	L15	R15
29/02/2012	77.93	C17	G17	L17	R17
15/03/2012	87.64		G19	L19	R19
28/03/2012	92.57				R20

Table S2. Primers used for SNP detection and transcipt level analysis.

Candidate gene	Forward primer	Reverse primer	references
re-sequencing			
ABH1	GAGTCATGGTCGGTGTTGAA	ACAGCTGATGGGTCCAAACT	
ARP4	GCATCCAATGCTACTTGCAG	GCCTGATGCAAAAGATGTGA	
BRI1	TCATGGCAATGTTCAAGGAA	AAATTGGGGGAGCTGAAAGT	
CAC	GCTCTACTGCCCAAACTTCG	GGCGTGTCTACACTCACTGG	
CAL	TCCTCCCCTTACATGACTGC	CCTGATGGTCTTTCGGTGAT	
CALb	AACTCCTGCAGCCTTGTCAT	ACTGCAAACCATCAACCACA	
CALc	GCTGGGAATCAAATGGAAGA	TGCTTCCTTCCTCCAGAA	
CALd	CTCTTCAACAGACGGTGCAA	GGAGAAAGACAACGCCAAAG	
CALe	GGTTCAGGCTAGGAGCAAGA	GAACTGGGAGGGCAGTACAA	
CALf	TCTCCAGAATGGGGTTATGC	ATCATCGTCGGCTTTCAATC	
CLF	TGCTGCTCTGGATTCATTTG	CTCGCAACAAGTCCCATTTT	
COL2	ACATCCGCCAATCTATCTGC	CTACCCTTCGCTTTTGCATC	
COP1	CATTGACATGAAAGCGAACA	TGCAGAGGCAAGCTCATAGTT	
CRP	TTGGCTGATCATGTTCCTCA	GCACCACATACCACCACTTG	
DAM5	CCACATCAAACTGAGTAAGGAACTC	CTGCCTTAGCTGGTTGTTGGCTTCAACT	
DAM6	TACTGGACCTGAGCTCATGGAGCC	TGTTGCAGGTGGTGGAGGTGGCAATT	
DDF1	TTTGACATCAGCATCGGTTC	GCATCCAATGCTACTTGCAG	
DDL	CAGGGGTAGTTCTCCACCAA	AACCCTTTTCCCTTTGCATT	
ELF3	CTGCGGTGATGCCTCTTAAT	GTCAAGGGCGTGTTCTCATT	
ELF7	TTGGCTTACATGGTCCCTTC	GTGCAATCTTCCGTGGTCTT	
ELF8	AGATTCTGATGCCGAGGATG	GGCCTCTCCATTCCCTTTAT	
EMF2	GTGGAGCCAGATACCATTGG	AAAATCACATTTCCTGCCCTTA	
ESD4	ATGCTGCAGTGCCTTAGACC	GGGTAGTCCACCTTCTGACG	
FAR1	GCCAACAAGACTCCTAGAAGAGC	ATGGAACTGTGCTGCTGATG	
FCA	CAGGTTTTGGTCCTCGATTT	GACGTGTGGCATAGACTGGTT	
FIE2	AGTTGGTCTGTTGCCATCCT	CAGCCACAAGAAATGGGTTT	
FIO1	CTGCCAAGAAGATTGCATCA	TTCAGGTTACACAATGCACCA	
FKF1	GAGGCTGTTTGTTGGAGGAA	AACCTCAAGTGCCCACTGTT	
FL2/LFY	GACCTACGAGGCATGGTTGT	CAAGCAAATCCCACCTGAAT	
FLD	GCGCCAATTCCAAATACAGT	TTTTGTGACCCAATTCGACA	
FRI	TGGCATTGAGAACGTGAAGA	TACCGCATCAAGCTGTTGTC	
FRS5	TCGCATACTTGCTTTGCATC	CGGCAAGAAGGATTCTGGA	
FRS6	CATGGACAATCTGTGCTGCT	TCCCTTCTTCCACAACTTGC	
FRS8	AGCCGCAAGAAAGAAACAAG	GCTGAACCCGGCAAAATACT	
FT	TTCATCGCTTTGTTTTGGTG	AAGGAGTCGACATCCCCTTA	
FYPP3	ATGCTAATGCATGGCGGTA	GCCCCTCGTGTGGAATTT	
GA2ox	TTTTGGACAGAACCCAGAAGA	CTGTGCCTCACACTTTGGAA	
GA20ox	TTATCTCCCAACCATCGAGTT	TCATCACTGCGAAAGAAACG	
GCR1	TCCTCTGCTACGTTCTCTTCAA	AAACGCAATCGTGGTAGTCC	
GH17_101	GAGGCACACTTGCAATACTTCTT	TAGGTTTCTATGGCCCTTCC	
GH17_44	TAGGCTGGCTCAGTTTGTCC	AGTTGGGTTGGGTCTTTGTG	
GH17_61	ACGTGGTTCTGGGGATACAG	GCATATGTTGGCTCCCAAGT	
Gh17-33	GCTTCTGGTTCTTTGCTCAGTT	TGGATCAGAAATCCCCTGAG	
GH17-39	CTGCCCTGCAAATAACAGGT	GGTTGCAGCATTACCACCTT	

Gh17-65	GCGACCAGCACTAGCTTCAG	GCGACCAGCACTAGCTTCAG	
GI	GGCCTGTAGCAGCATTTGAT	GGCTTCAGCAAGAAAAGTGC	
HYL1	ATCAGACAAATCCAGGTACTCC	TGGCCATAGCTCTGACAGTTT	
KS	GCATTTCGGCTCTTACGTGT	TGAAGTCATCCACTGCCAAT	
KSb	CTAAAGCGGTGGAGTGTTGG	TGCTCTTCATCGGTAGCTGA	
KSc	GTGGCCGTCTTCTCAATGAT	CAAATTCTTGCATGCTCTTGG	
LDL1	AGCGTATGCTCTTGGATTGG	TCACAGACTCCACAGGAGACA	
LDL2	AGTATGCCAGAGGAGGCAAC	CCCCACCCATCTCATAAGG	
LHP1	GAGGCTGTTTGTTGGAGGAA	AACCTCAAGTGCCCACTGTT	
LHY	GCTGCTGCTGATGAGAAGGT	TGCATTGTTGTCTCCTACGG	
MBF1A	GCCGCTAAGAAGGATGAGAA	GTTTCCTCATCGAGCTTCCT	
MBF1C	GAGCAGAAACCCAGGAGTGA	CACTTCCAGAACCCTCTCCA	
MMP	CTCCAATTTCACCGACGACT	GAGTGCCAAATCCCCAATAA	
MSI1	AGAACGATGCTCGCCATTAT	TGACGGTCTTTGTGGCAATA	
NUA	GCTGAGTTGCCTCAAGGTTC	CCGGAGAATTTACCTCACCA	
OTS1	CAGTATATGGAACCAACTTCCCAAT	TTTTTCCTTTGCAGCCTTTG	
PHYC	AGTTCCCATTTTGGCTGTTG	GCAAACGGGTATATTTGTCCA	
PIE	GGGGGTGTTGGAATAAACCT	AACAGCTTCCTCCTGCTCAA	
PRR7	TTGTACTCGCCATGTTGTCA	GACCAACACCGGATAAGCAT	
PRR9	TGCTCAGGGTTCTTCTGGTT	AAACATGCTGCCAAAGGTTC	
REF6	ACCAGGAGGTGTTTTCATGG	AAAGGGTTTGTCCACAGTCG	
SAR3	TGCAGGTCTGTTGATGGGTA	ACCAAACGAGCAGAGGAAGA	
SDG2	GCAAACTACGCAAGTAGAATTTGTC	CTGATGCTTCGTATTCTTCCTT	
SDG26	TGCTCTGTTTGACGGAACAA	GGCAATATCCTGGAGTGCAT	
SOC1	GCGAGCAGACAAGTGACCTT	CCCACGCTCCATATCAACTT	
SPA1	ACCAGTCCAGAGGAGCTCAA	CAGCGGATTTTGTGAAAGAA	
SUF4	GACGTCTTGGCTGCACATTA	TGAGGGAAGTTGTGGAAACC	
SVP	GGAGCTCTCCGTTCTCTGTG	CGTGCAAGTTGTGACGTTCT	
SWN	AGCAAAACAGGGATGGTGTC	CAAGCAACGACGACAGAAAA	
TUB	CACTGAGGGTGCAGAGTTGA	TCAGGCAGCATGTAACTCCA	
VEL1	GATGGCAAAGGATACCAGAC	GGACTTCATCTCCAGCAGTA	
VIL1	TCTTTCAAGATGCGAGATGA	GCTTGCTTTTTGGGAAGATG	
VIM1	TGACAATGAACCTGCACCAT	TTGTGTGCTTTCCTGATTGC	
VRN1	TCCATCAAAGGGTTCTGGTC	GCAGCTTCGACAACACAAAA	
VRN2	TCACCTGTGCTCTTCACATGA	AGTCCCTCGTGTACAATTCCA	
qPCR			
qACT	CGGTATTGCAGACGGATGAGC	GGTACTGAGGGATGCAAGGATGG	Wang <i>et al.</i> , 2012
qARP4	GACGGCGGAGCTTATGTTT	TGGTTGATCCTCCACCACTATC	
qEMF2	GGCTGATGGGAGCAGTCAA	GCTCCCACAAAGCTGACAAA	
qNUA	CCCTGAGGGTACCTCTGTTGT	GGAGCACCATGAGTTCCAAA	
qPIE1	GCAGCGGTTTAACACAAATC	CGATCTTGAGCTTGTTGGTC	
qFT	GGATCCTGATGCACCTAGCC	CCTACCCAATTGCCGAAAC	
qSVP	CAGCAAGTGCTGGAGAAACA	CAGAGGTTGGTGGTGACAGAC	
qDAM5	CCACATCAAACTGAGTAAGGAACTC	CTGCCTTAGCTGGTTGTTGGCTTCAACT	Leida <i>et al.,</i> 2012
qDAM6	TACTGGACCTGAGCTCATGGAGCC	TGTTGCAGGTGGTGGAGGTGGCAATT	Leida <i>et al.,</i> 2012

	process.	
	owering 1	5
ξ	≓	
	E	
-	d	
	involve	
	$\mathbf{\tilde{s}}$	
(2	
	_	
	Б	
	5	
;	f	
ĉ	2	
Ē	lable	

Gene	Name	Predicted gene (P. persica)	Linkage group	Predicted gene (P. avium)	Amplificati on	dNS .		NP 100-	Mai	Co-localisation with QTL (parental group)	sequence used by Sequencom
Photoperiod						-					
ELF3 FKF1	EARLY FLOWERING 3 FLAVIN-RINDING KEICH REPEAT F ROX 1	ppa002858m		PRUAV005120 PRUAV007655	yes	8 8					
EYPP3	FLOWER-SPECIFIC, PHYTOCHROME-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE 3	ppa009178m		PRUAV002173	yes	intron	[T/C] [r/c] [1/	(c] 1	CR, HR (R1) and CR, HR (G1)	AGGCTTCTTGCATGGATATAGGTTTCTTAGATTCTGFAATTTTGCC/#1GTGTTAATCAATTGAAAGGACACTTATCCCCATGAATGTTAGGTTAGCTT
CRP	CRYPTIC PRECOCIOUS	ppa000036m	2	PRUAV011448	yes	8	. 1				
FAR1	FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1 LIKEHETROCHROMATIN PROTEIN 1	ppa001996m nna021305m	~ ~	PRUAV021842 PRUAV004644	yes	intron .	5.	E .	E .		AGGINITIC CIMANINI GGGTCCCI ICIGAMACIGNIGA TITITIGA GAI CYT. GIGGIC TITICCAAT CAAGAGAT TICACIGI GCCAAAAA CAGATA ACATT
ιHΥ	LATE ELONGATED HYPOCOTYL	ppa001765m	2	PRUAV00054	yes	5'UTR	[A/C] [.	(v)	/C] 2	CR (R2)	SCTIGATECCAGTOSCTEVECTOTOSAA ASCTUTOT SUCCACIA TES (A/CL) TUTUCIA ARAASER COOTTUGATITUCCTCASSAATTS ATTUSSOC TITET
PRR9 SPA1	PSEUDO-RESPONSEREGULATOR9 subbressor of phys. 105.1	ppa007290m	2 6	PRUAV002351 PRIAV014379	multi	. ş					
COL2	CONSTANS-LIKE 2	mc000000dd	9 F	PRUAV007294	ves	intron	[T/C]	r/c]	3 (C]		TITITIG TO A TOGOCIAN OGGORANCA OCCAGATO TO A TOCTO GOC [2/4] INSTITO GOCTAGORA CTAATTOC TITIGGOGG AN CTGOG GOGAC
FRS6	FAR1-RELATED SEQUENCE6	ppa002952m	e	PRUAV011091	yes	exon	[A/G]	VG]	3 (V)		AGTATGAA GOMETINA AGMATCTE TENGENG AGOMETET ACTACTCT CTG AAGA GOMEGAGA AGOMGCAGC ATGGAAGA ATMAGAC CAGOGCCATGGA
FRS8 MRF1A	FARI-RELATED SEQUENCE8 MULTIPROTEIN RRIDGING FACTOR 1A	ppa001906m	m m	PRUAV037910	yes	exou	[]/[]	E,	. 5		TCTAACAGATGGARGAGTGAA GTCAAGCTTGAACACAACAATTAATTI TATTI TAT
PHYC	PHYTOCHROME C	ppa000506m		PRUAV008814	yes	intron	[g/g]	s/G] [A	(G) 3		AGATATAA TEGTITGE AATTAAAT AGAGATA COTOTICT GGATTOTI TIT [A/G] TUTOCA TOTORIGO AGTAAGTGGA AATTACAG TTATGOA TOTOCA
DDL	DAWDLE CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1	ppa005178m	4	PRUAV004162 PBLIAV007932	yes	exon	E/J	5	ŧ.		GGACAMAA COGTTAAG AAGAOCTC AAOCTOG CAGAGAGG CTGTGAAA GAA <mark>[C/t]</mark> CTGAAA GAAGTAAT GGGAGGGGAACTGATA GGGGTTAA CAGATGAAGGG
FRS5	FAR1-RELATED SEQUENCES	ppb008343m	9	PRUAV035276	yes Yes	exon]	₹ E	ou E		ACTIVATIC TUGTAATC TUGTTATT TOTTTATT GTOTTTOA A TA TAATTGA ATA LA A JA GAGTO TUTUTUCT TUTUTGUSTATT TA GAGTIGTATO ATAATG
PRR7	PSEUDO-RESPONSEREGULATOR 7	ppb022850m	9	PRUAV000380	multi				•		
fl01	FIONA1 GIGANTEA	ppa003576m ppa000556m	00 00	PRUAV020955 PRUAV000817	yes yes	exon	UN DI	10 10/1	8 (C) 8 (G)	HR (G8)	TO THY TAY TO A TO A THY A THY A THY AND A THY ACTOR OF TO THE AT A THY AND THY A THY AT A THY A THY AT A THY A THY A THY A THY AT A THY A
Te mpe rature											l
ESD4 FRI	EARLY IN SHORT DAYS 4 FRIGIDA	ppa017866m ppa004224m		PRUAV016402 PRUAV000207	yes	intron	- [c/c]	- D]	(c] 1		TSCATGAT COTSCATG TTO TROACT TTOAGT CATATACT AGAINT SCTTTOCA AAG [C/T] GTTGTO TSCATTOCATACATATCCA AATTCOAG TTATGTS TOTGT
	1 ACINE OPENER, PRAGMAN A CO	a control E O doo		A 207201 (A 100	Time	intron	[C/G]	:/c] [G	(G) 1	CR, HR (G1)	GEOTIGAT GATGAGG ATTOTICA GEOATTC ACATCCTT GIVENED TTT LOAD TATT CTTTGGAA AAATGECC TRAGAGT GOATGAAC TTOAGTC FECTT
VELL	LTSINE-SPECIFIC DEMILITIZASE I V ERNALIZATIONS/VIN3-LIKE	ppa001943m		PRUAV000723	yes Ves	intron	- LL/LI	E E	. F		TACCAACGATGTAATT GTGATAATTAGTATTAGATGTTTT CAT [6/F] TATAGTAGAGAGTTGTCTA GTTTCTTC GTTTCTTC GTTTCTTC GATTCACAAAAAA
USI1	MULTICOPY SUPRESSOR OF IRA 1	ppa006205m	2	PRUAV005812	yes	9			•		
SDG2	EARLY FLUWERING / SET DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2	ppa000145m	n m	PRUAVOUS1/3	multi				•		
ABH1	A BA HYPERSENSITIVE 1	ppa001278m	4	PRUAV006660	multi				•		
ARP4	A CTIN- RELATED PROTEIN 4 EAMEDYONIC ELCIAGE 2	ppa006685m	4 4	PRUAV010449	yes	Intron	[C/C]	() () () ()	£ 5	CR, HR, FD (R4)	Transmission Account of Control Artificial Control and Control Article Artificial Control Artificial Transmission Artificial Artificia
ENITZ FIE2	EVENTION: FLOWER 2 FERTILIZA TION-INDEPENDENT ENDOSPERM	ppa007346m	4	PRUAVO11214	yes	intron			: =	CR, FIG, FU (K4)	TAUANDE TAULLIC LONGEST TO CONCENT CONCENTION AND LONGENT TO SET OF CLUCTURE CONCENTER TO CONCENTE CULTE LOUGE TARAGTOGATTACTAGAATTACTAGAATTATCTAGAATTACTAGAATTACAATCAAT
LDL2	LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLA SE 1-LIKE 2	ppa001881m	4	PRUAV023731	yes	9	-		. 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	
NUA DIE1	NUCLEAR PORE ANCHOR B HOTOPERIODALIN DEPENDENT EA BLY ELOWERING 1	ppa000061m	4 4	PRUAV002346	yes	exon	[c/c]	Ę	4 Hold	CR, HR, FD (R4)	AGTTGAT GOTTCAAA TCAAGTAG AATCACA ACCTGACA AGCATATT GOT [G/Y] TAGAAG AAAATGTT GATGATC AGGTGGATGATGATGATGATGATGAT
SUF4	SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4	ppa018474m	4	PRUAV059158	yes	intron	[L/J]	E	T	2	TA TCCAATCO CCATCGAA CCTGGTAC CAACAAA CTGGGTTGA [C/T] GGGATGTCC ACTTTAG CTAGTTGT GATGGAGC GTCCTCAT CTGCAAAT A
REF6	RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6	ppa000214m	s	PRUAV019148	multi				•		
1 MIV	V ARIANT IN METHYLATION 1 V EDNA17ATION 2	ppa015406m		PRUAV042637	yes	intron	E		5	1907.00	CONSTRACTOR ANALAGO: PARAPTARA FIXANCITA KATUCARA GTOCARA ATO E (APA) - ACTITICO GOTOCITOT OFFICIA COLTARIO CONTO CONTO ACTIVA COLTARIO CONTO ACTIVATO ACTIVAT
SVP	SHORTVEGETATIVE PHASE	ppa011063m	9	PRUAV004879	yes	intron	[A/G]		9 (0)	FD (R6)	AMATTTS AGGTTGGTTGTTT ATTTATTSGGGGTG AMAATSA GAA AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
CLF	CURLYLEAF	ppa001213m	7	PRUAV022733	yes	intron	[g/g]	V.e)	(e)	CR, FD (R7)	ANGAMAMA TATTGTCA GOCTGAGA MACAACC TCCTTGGA GCTCTCCA GAT AGC COAMA ATCCATCA TGTGGTCC AMATTGCT ATCGATCA GTACGTGTGTTG
ELF8 MRF1C	EARLY FLOWERING 8 MULTIPROTEIN RRIDGIMS EACTOR 1C	ppa015419m		PRUAV003418 PRUAV024737	yes	exon	[c/c]	Vd	2 1 2		I CUBACIN DE PALACIÓN CONSTANTIN TOTROCI GARANICON TRADARIA CON <u>INZO</u> ANORTIN CONTOCIÓN DE ANALINEN L'ONTONA TOTROTAN ROCTINA GARADACENTICIARCIANA ACONTOCIAN CONSTANTICAN TRADARIAN IN INZO ANORTINO DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN TRADARIO DE ANALACIÓN TRADARIO DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN TRADARIO DE ANALACIÓN DE ANACIÓN DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN DE ANALACIÓN DE ANACIÓN DE ANALACIÓN DE ANACIÓN DE ANACIÓN DE ANACIÓN
VILI	VIN3-LIKE 1	ppa002105m		PRUAV029314	yes	intron	[0/0]		ou [4]		GUTMENT OF A COMPANY ATTITUTE CONTROL THE CONTROL AND A STREET AND ATTIC AND A CONTROL AND A STREET ASTREET
SWN	SWINGER	ppa001254m	80 0	PRUAV016583	yes	intron	[V/A]	VA]	(G) 8	FD (R8)	Teactors of the tractific caling to cooptific transaccian [A/a] teames stortage for an attent stream escott casa
Dormancy	VERNALIZATION 1	ppa006901m	8	PRUAV009961	yes	8					
CALD	CALMODULIN BINDING PROTEIN	ppa008039m	1	PRUAV006432	yes	exon	[c/c]	c/c] [c.	1 E		TCTSCTSC TSCTTOAG CTTOAMS GAMACTSAM AGAMACTSAM AGA (C/T) TTTCTS CTGTTTOG MSGGAT CARAAGA AGAGCAAC AGATAMA GATOC
CALF	CALMODULIN BINDING PROTEIN	ppa000516m		PRUAV004837	yes	8					
DAM6	DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX	ppa010822m ppa010714m		PRUAV007453	ves	8 8			m sm	0 FD(L1)	
GH17_44	GLYCOSYL HYDROLASES	ppa024457m	1	PRUAV004835	yes	exon	[e/g]	s/G] [C	(G) 1	CR, FD (R1)	ATTTGBAC COARTTAT ROOGSTTATGGCTAAT CACCACTA CTT [C/G] CTAACA TATTTTAG TATTTTAG TATTTGGAAATCCT AGAGATA TTTCT
CALC	CALMODULIN BINDING PROTEIN	ppa001109m	6 6	PRUAV000501	yes	exou	E(1)	c/cl [c,	2 E		CTGAAGAG AMAATTTT COCATGGA GAAAGCAATTCOAAC CAAGAACTTOC [C/T] GACACC TGCAACTA CGGAAGAG GAAGCAAATTCAAGAG ACTTAGG GTGGA
GH17-39	GLYCOSYL HYDROLASES	m666/00edd	n 4	PRUAV000077	yes	intron	[T/A]	VA]	ou [v]		GTATTTUCI GTTTCATT ATATTA GAATTA TGATATATTCAAGCATATA (7/Å) ATACCA TGCAGAAA ACTTUCIGG TTTCTTTA TCCAATTTTTTAATT
						intron] [1/1]	(A) [F)	n [T		ASCOMMAT DESERVAGE SEGRET TO CANCAT ASAMCCT CONTRONA GOS (T/A) SACTACT TO ACT TANDAT STOC COTTROTT CONAT
CALE Gh17-65	CALMODULIN BINDING PROTEIN GLYCOSYL HYDROLASES	ppa004675m ppa006239m		PRUAV024877 PRUAV000103	yes ves	8 8			•		
GH17_61	GLYCOSYL HYDROLASES	ppa007079m	9	PRUAV000448	yes	intron	1 (1/1)	2) E/3	(c) e		AACAMAA IATATATA TCAGACAC TTGAAAT TTGAAACT CTGTTTC TCT [C/T] CATCCAATTGAATT CAATCTTTTCTGTTTTTTCTGTTTTGAATCAGTT
GH17_101 GH17-33	GLYCOSYL HYDROLASES GLYCOSYL HYDROLASES	ppa025430m ppa007158m		PRUAV00060 PRUAV005464	yes ves	intron	[A/G]	V6]	(C] 7		ALMITTC CALORADAC COFCOCCO CONTENT CARAGACOR CANTANA CAE I COLAMA ANTECATIC COLAGATAGACONTES CONTENT TESTA ALTISTI DATTIGATI CALTATAKA MANANGT ANTECTATI TESTATI DATA ANTENA ANTEGATA COLAGATAGACONTESTA COLAMA TITO.
CAL	CALMODULIN BINDING PROTEIN	ppa006697m	8	PRUAV016855	yes	exon	[c/c]	c/c] [c.	8 8		TTACAAGT TSGGAGCA ATSGAGCT GATGAGC CAGGTCCC TCOGGTT TTC [C/T] COSAGG TCACCGTC TCCAAGAG CGTCGAGA CTTTCCCA AGGAAAG AAATT
Autonomous FCA		0.0a002369m		PRUAV05057	VPK	g		_			
fD	FLOWERING LOCUS D	ppa001272m	5	PRUAV017206	yes	8					
Gibberelin GA2ox	GIBBERELLIN 2-OXIDASE	ppa008414m	4	PRUAV012448	yes	9			All S III	0 CR, HR, FD (R4)	
GA20ox	GIBBERELLIN 20-OXIDASE	ppa020361m	4	PRUAV072687	yes	9			- In silv	0 CR, HR, FD (R4)	
88	KAURENE SYNTHASE KAURENE SYNTHASE	ppa018714m	4 4	PRUAV034493 PRUAV032409	yes	8 8			m sun	0 C.K. HK. F.D. (H4) 0 C.R. HR. F.D. (H4)	
KSc	KAURENE SYNTHASE	ppa019543m	4	PRUAV058967	yes	8			Alls ni	20 CR. HR. FD (R4)	
DDF1 Floral integratio	DWARF AND DELAYED FLOWERING 1	ppa021197m	ŝ	PRUAV084930	yes	intron	[0/6]	s/G] [A	2	FD (R5)	OCONOCIO OGNOGAGO ETTITICAN GONONCO NOCIONITITA GOO [AVO] CONONCONOCIANTONO ANTONO ANTONO ANTONO ANTONO ANTONO
FL2/LFY	FLORICAULA / LEAFY HOMOLOG 2	ppa006372m	s, r	PRUAV036733	yes	intron	[c/c]	(J) [J/:	(c] 5		GCTGCOGC TECHECTG COGCTIAC GCTGCOG TGAGGCOGOGAGAGA GCT (TACT GAGGGC CTTGAGGA CTTGTTCO AGGCTTAT GGGGT CAGATACTAC ACGGC
Г, E	SUPPRESSURUE OVEREAFRESSION OF COLL	ppa012320m	n 9	PRUAVO02555	yes	- Q			- in sill	0 FD (R6)	
Other GCB 1	G-PROTEIN-COUDLED BECEDTOR 1	m088800en n		DB11AV/007A11	VIDE	s					
HYLL	HYPONASTIC LEAVES 1	ppa004305m		PRUAV015329	yes	intron	[V/V]	×	(A) 1	FD (L1)	TTAGTGAT TATGGGAA TAAGGTTT AAATTTT TAAGTTTT COGTTTT TAY (A/T) AATTATA ATTTTGGGTTT GGGGTTTGGGGTT GGGGTTT CAGTTT TAGTT
MMP	MATRIX METALLOPROTEINASE	ppa007227m		PRUAV015398	yes	exon	[C/G]	s/G] [G,	(G) 1	CR, HR (G1)	GACGGAGA GOOGTTOGATGGGGTT TTGGGGA CGOTGGCG CACGOGTT CTC [C/G] COGOGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGGGACGGGGGGGGGG
SAR3	OVERLY TULERAN I TO SALE A SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE 3	mpa000667m	- 2	PRUAV007201	ves	exon	[I/V]	<u>ح</u>	[A]	HR, FD (G8)	TNGAGAGG AACTTATT GACATGGCTATTGATTACTCACT AGATTTTC ACA (A/F) GGGATT ACTTCATC AGACAGAA GAGATTGA AGTTGGAT CCTTTAA CCTTAA
CAC	CHLOROPLASTICA CETT/COENZYME A CARBOXYLASE 1	ppa009593m	e	PRUAV000620	yes	9					
BRI1 TUB	BRASSINDSTEROID INSENSITIVE1 TUBILIU BETA CHAIN 2	ppa000566m npa0004884m	9 9	PRUAV002156 PRUAV000236	yes ves	intron	- Lic/Li	- U	. 9		GAMANG AGTITTO CAAGGAAG GGATGAT CTAATCTTTOTTTOTTOT 10 1 10/1 1 GGAGT CTGAAAGG ATGAATTG TOTGTOT GTGATAG TGA E T
SD G26	SET DOMAIN GROUP 26	ppa023092m	00	PRUAVO18408	multi	-					

Supporting Figure

Fig. S1. DAM5 and DAM6 position established *in silico* according to the high synteny between cherry and peach.



Fig. S1. *DAM5* and *DAM6* position established *in silico* according to the high synteny between cherry and peach. *DAM5* and *DAM6* positions are indicated by *isDAM* (*is* for *in silico*). QTL region involved in flowering date is represented by a green segment.

Discussion et Conclusion

Chapitre IV. Discussion et Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse était de mener une étude sur la floraison du cerisier doux en vue de son adaptation aux futures conditions climatiques. Cette étude était basée sur l'approche QTL/gènes candidats afin d'identifier des déterminants ou régions génomiques majoritairement impliqués dans les processus de floraison.

Dans un premier temps, nous avons étudié le déterminisme génétique de caractères liés à la floraison en analysant les besoins en froid et en chaud et la date de floraison. Une détection QTL a été réalisée pour ces trois caractères. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les déterminants moléculaires impliqués dans la floraison et associés aux QTL détectés. Suite à l'identification de gènes candidats, nous avons étudié l'expression de gènes prometteurs au cours de la dormance afin de déterminer des différences d'expression pouvant expliquer les différences de dates de floraison ou de besoins en froid et en chaleur.

I. Contrôle génétique

Evaluation phénotypique

L'analyse statistique de nos données phénotypiques nous a permis de mettre en évidence une forte héritabilité des besoins en froid et de la date de floraison suggérant un faible effet des conditions environnementales sur ces caractères. En revanche, pour les besoins en chaud, très variables d'une année à l'autre, un effet de l'environnement pourrait expliquer ces résultats. Une autre hypothèse serait que ce caractère n'est pas évalué avec précision. En effet, le point d'origine pour l'accumulation en chaleur est la date de levée de l'endodormance et début de l'ecodormance. L'optimisation du modèle de Richardson *et al.* (1974) ainsi que le développement de nouvelles techniques d'analyses plus fines pour l'identification du début de l'ecodormance nous permettraient de mieux phénotyper ces besoins en chaud et ainsi d'avoir un caractère plus stable pour la détection QTL.

Corrélation et héritabilité

Une forte corrélation entre années (entre 0,7 et 0,9) et une héritabilité élevée (0,9) ont été obtenues pour la date de floraison. Ces résultats sont très similaires à ceux trouvés chez d'autres espèces de *Rosaceae*: le pommier (Celton *et al.*, 2011), le rosier (Kawamura *et al.*, 2011), le pêcher, l'abricotier, le cerisier doux (Dirlewanger *et al.*, 2012). Des résultats comparables ont été également obtenus pour des besoins en froid (entre 0,6 et 0,7 ; 0,83), en

accord avec ceux trouvés chez le pêcher (Fan *et al.*, 2010). Ces valeurs suggèrent un fort contrôle génétique de ces caractères chez le cerisier.

Au contraire, ces valeurs sont faibles pour les besoins en chaud (0,35; 0.43), résultats confirmant ceux obtenus pour le pêcher (Fan *et al.*, 2010). Ceci suggère une forte interaction génotype × année pour les besoins en chaud. Les corrélations non significatives en 2012 avec les autres années coïncident avec le retard anormal observé dans l'accumulation de froid. Ceci est cohérent avec l'influence d'une levée de dormance partielle résultant d'une accumulation de froid insuffisant, phénomène déjà observé chez d'autres *Prunus* (Okie & Blackburn, 2011).

L'étude sur des années contrastées au niveau climatique a permis l'identification d'interactions intéressantes entre les besoins en froid, les besoins en chaud et la date de floraison. Ainsi, on peut noter une corrélation négative significative entre les besoins en froid et les besoins en chaud, similaire à celle déjà trouvée chez le pêcher (Pawasut *et al.*, 2004) et l'abricotier (Campoy *et al.*, 2012). Ceci suggère que, plus une variété aura des besoins en froid élevés, moins elle aura de besoins en chaud, et inversement.

De plus, la corrélation forte entre les besoins en froid et la date de floraison, observée chaque année, suggère la forte implication des besoins en froid dans les processus de floraison. Des résultats similaires ont été trouvés chez l'amandier (Sanchez-Perez *et al.*, 2012), l'orme (*Ulmus spp.*) (Ghelardini *et al.*, 2010) et le pêcher (Okie & Blackburn, 2011; Fan *et al.*, 2010).

Ces résultats préliminaires nous laissent supposer que la floraison chez le cerisier va impliquer la voie de réponse à la température. Cette voie pourrait faire appel aux deux mécanismes proches de ceux observés chez *Arabidopsis*, la vernalisation et la réponse à la température ambiante. En effet, les besoins en froid durant la dormance seraient contrôlés par des mécanismes similaires à ceux impliqués dans la vernalisation chez les plantes annuelles. Ce mécanisme ferait appel à la régulation épigénétique de gènes similaires à *FLC*, les gènes *DAM*. La modification de la chromatine, issue de cette régulation épigénétique, au niveau de ces gènes induit la répression de leur expression et favorise l'induction florale. Ces gènes *DAM* ont déjà été trouvés chez de nombreuses espèces pérennes comme le framboisier (Mazzitelli *et al.*, 2007), l'euphorbe (Horvath *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2010), l'abricotier japonais (Yamane *et al.*, 2008), le poirier (Ubi *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2014), et le kiwi (Wu *et al.*, 2012). L'étude de l'expression de certains de ces gènes dans des plantes transgéniques a confirmé leur implication dans les mécanismes liés à la dormance et à la

floraison. Les besoins en chaud, quant à eux, joueraient un rôle dans la réponse de la floraison à la température ambiante en favorisant l'induction florale.

Détection de QTL

Le phénotypage des caractères étudiés est un élément essentiel dans la détection de QTL. Les biais engendrés dans l'évaluation des caractères ou une héritabilité trop faible des caractères peuvent avoir un impact sur la précision de la détection QTL.

En raison de la taille de nos familles, seuls les QTL avec un effet important ont pu être détectés. Par conséquent, le nombre de QTL détectés est considéré comme une estimation minimale des QTL impliqués dans nos caractères.

Dans cette étude, six QTL impliqués dans les besoins en froid et six QTL impliqués dans les besoins en chaud ont été cartographiés dans $R \times G$, alors que six et 11 QTL impliqués dans la date de floraison ont été cartographiés dans $R \times L$ et $R \times G$, respectivement. Dans ces deux familles, un QTL majeur, expliquant la part la plus importante de la variation observée pour la date de floraison, a été cartographié dans une même région génomique. Ce QTL co-localise avec un autre QTL impliqué dans les besoins en froid. Ce QTL majeur détecté sur le groupe de liaison 4 de 'Regina' co-localise avec un QTL majeur trouvé chez l'amandier (Sanchez-Perez *et al.*, 2012), l'abricotier (Dirlewanger *et al.*, 2012) et le pêcher (Fan *et al.*, 2010; Dirlewanger *et al.*, 2012).

Un QTL majeur impliqué dans les besoins en froid a été identifié sur le groupe de liaison 1. Il co-localise avec un QTL impliqué dans la date de floraison. Ces QTL correspondent à un QTL majeur identifié chez le pêcher, l'abricotier et l'amandier. Ce QTL recouvre la région du gène *EVERGROWING (EVG)* chez le pêcher, et coïncide avec la région des gènes *DAM* (Quilot *et al.*, 2004; Olukolu *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2010; Sanchez-Perez *et al.*, 2012; Romeu *et al.*, 2014). L'identification de ces gènes *DAM* au niveau de régions impliquées dans les besoins en froid, ainsi que les nombreuses co-localisations entre QTL de besoins en froid et de floraison suggèrent que ces deux caractères seraient contrôlés par des acteurs communs.

Ces résultats sont en accord avec les résultats préliminaires obtenus par génétique d'association (genome-wide association study, GWAS) effectué au laboratoire (Robert, 2013) sur la collection cerisier (CRG de INRA de Bordeaux). En effet, cette étude a permis de mettre en évidence des associations intéressantes dans le déterminisme génétique des dates de floraison. La présence du QTL sur le groupe de liaison 1 est confirmée par l'association du SNP Rsweet_1_43706470 avec la date de floraison. Le QTL du groupe de liaison 4 est, quant 211

à lui, révélé par l'association du SNP Rsweet_4_7731253 avec la date de floraison et a permis de mettre en évidence l'implication du gène ARP4 dans le contrôle de la date de floraison.

Le QTL majeur détecté pour la date de floraison sur le groupe de liaison 4 est un point essentiel de cette étude. La différence significative de quatre jours observée pour les deux haplotypes pour chaque année nous suggère que l'utilisation de marqueurs SNP sélectionnés dans cette région est possible pour développer une approche de sélection assistée par marqueurs permettant la création de génotypes mieux adaptés aux conditions environnementales prévues suite aux changements climatiques.

II. Contrôle moléculaire

Cartographie des gènes candidats pour la floraison chez le cerisier

Pour la grande partie des gènes candidats fonctionnels impliqués dans les processus de floraison décrits dans diverses espèces, il a été possible d'identifier des séquences homologues chez le cerisier. Ceci suggère une relative conservation des mécanismes de floraison chez les végétaux.

Parmi les 79 gènes analysés, 70 ont donné un produit d'amplification unique, et 40 d'entre eux présentent au moins un SNP. La plupart des SNP (~ 60%) ont été trouvés dans les régions introniques, montrant une plus grande variabilité que les régions d'exons. Trente-quatre gènes candidats, parmi les 35 cartographiés, co-localisent avec leurs homologues pêcher. Ce résultat confirme la forte synténie entre le cerisier doux et le pêcher. Ce point nous permet d'établir que la synténie cerisier-pêcher est suffisamment robuste pour envisager la cartographie *in silico* de certains gènes candidats intéressants, pour lesquels aucun SNP n'a pu été détecté chez les parents des descendances de cartographie à partir des séquences disponibles sur l'unigène. *SAR3* est le seul gène qui a été cartographié dans un groupe de liaison différent entre le cerisier (groupe de liaison 8) et le pêcher (groupe de liaison 2). On peut alors penser que ce gène est présent en plusieurs exemplaires et que le polymorphisme a été détecté uniquement dans un seul locus.

Neuf de ces gènes candidats co-localisent avec le QTL majeur du groupe de liaison 4, QTL expliquant en moyenne 36% de la variation phénotypique observée pour la date de floraison (Castède *et al.*, 2014). Ces gènes sont des homologues de gènes connus pour être impliqués dans la voie de la température (*ARP4, EMF2, NUA* et *PIE1*) et les voies de l'acide gibbérellique (*KS, KSB, KSC, GA200X* et *GA20X*). Aucun homologue de gènes impliqués dans la voie de la photopériode n'a été trouvé dans ce QTL majeur, ce qui pourrait suggérer

que la photopériode a peu ou pas d'effet sur la floraison du cerisier doux. Cela a déjà été signalé chez d'autres *Rosaceae* : les *Malus*, les *Pyrus* et les *Sorbus* (Heide & Prestrud, 2005; Heide, 2011). Cependant, Heide (2008) a montré une interaction prononcée entre photopériode et température dans le contrôle de l'arrêt et reprise de croissance chez plusieurs *Prunus*, y compris le cerisier. L'absence de gènes candidats associés à la voie de la photopériode est peut-être également due à l'absence de variation génétique chez les parents pour d'hypothétiques gènes liés à cette région.

Au bas du groupe de liaison 1, trois gènes candidats (*DAM5, DAM6* et *HYL1*) co-localisent avec le second QTL le plus important pour la date de floraison, expliquant 8% de la variation phénotypique, observée chez la descendance R×L. *DAM5* et *DAM6* sont impliqués dans les phénomènes de dormance et agissent comme des répresseurs quantitatifs du débourrement floral (Jimenez *et al.*, 2010). Cette région commune avec le pêcher, région du gène *EVG*, suggère un contrôle génétique commun entre ces deux espèces de *Prunus*.

En partant des 200 gènes identifiés, notre analyse a abouti à la cartographie génétique de 35 gènes candidats. De plus, neuf gènes ont été positionnés *in silico*. Pour augmenter l'efficacité et la rapidité de ces analyses, l'exploration des données de RNAseq obtenues au laboratoire, mais non encore totalement analysées pourrait permettre d'identifier directement les SNP présents chez deux des trois parents. Toutefois, avec les données de RNAseq, on restera limité à l'exploitation des régions codantes. De plus, les informations sur les différences d'expression entre les stades de développement des bourgeons au cours de la dormance pourront faciliter la sélection de nouveaux gènes candidats prometteurs et seront complémentaires aux résultats obtenus par qPCR.

Etude de l'expression des gènes candidats

ARP4, EMF2, et PIE1 sont impliqués dans la voie de la température chez Arabidopsis. Les séquences homologues à ces gènes chez le cerisier sont toutes situées sur le groupe de liaison 4 au niveau du QTL majeur pour les besoins en froid, les besoins en chaud et la date de floraison. Chez Arabidopsis, ARP4, ARP6 et PIE1 sont requis pour le dépôt du variant histone, H2A.Z, sur la chromatine à de multiples sites, notamment au niveau du gène FLC ce qui induit son activation (Deal et al., 2007; Kim et al., 2009a). H2A.Z joue un rôle dans de nombreux processus impliquant le remodelage de la chromatine, tel que l'activation de la transcription, le maintien de l'euchromatine et la formation de l'hétérochromatine (Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). La sous-unité EMF2 du complexe PRC2 est connue pour réprimer l'expression de FLC (Jiang et al., 2008). Le complexe PRC2 joue un rôle primordial

dans l'établissement d'une mémoire épigénétique cellulaire pour la régulation par le froid de l'expression d'AGAMOUS-LIKE 19 et FLC lors de la vernalisation (Alexandre & Hennig, 2008). Chez le cerisier, la régulation épigénétique de la floraison peut se produire à travers le contrôle de la dormance des bourgeons. Des études récentes mettent en évidence la participation de différents mécanismes épigénétiques, impliquant la modification des histones, la méthylation de l'ADN et l'action de petits ARN non-codants, dans la régulation de la dormance des bourgeons (Ríos et al., 2014). La co-localisation de ces gènes avec un QTL majeur pour la floraison du cerisier pourrait suggérer l'implication de mécanismes épigénétiques. Cependant, aucune différence significative dans les niveaux d'expression n'a été détectée au cours de la dormance. De plus, aucune différence n'a été observée entre les quatre variétés analysées, 'Cristobalina', 'Regina', 'Garnet' et 'Lapins', même si elles diffèrent de plus de 30 jours de la date de floraison entre la plus précoce 'Cristobalina' et la plus tardive 'Regina'. Chez Arabidopsis, la mutation Atarp4, ou la suppression partielle de AtARP4 semblent avoir des effets drastiques sur le développement de la plante (Kandasamy et al., 2005). Par conséquent, il est peu surprenant que nous n'ayons pas observé de différences significatives dans l'expression d'ARP4. Cela est également vrai pour EMF2 et PIE1, qui sont impliqués dans des mécanismes épigénétiques clés. La régulation de ces gènes pourrait se faire au niveau post-transcriptionnel (épissage alternatif), ou au niveau post-traductionnel (changement structurel, changement de la nature chimique des acides aminés...). D'autres analyses sont nécessaires pour étudier le polymorphisme des séquences de ces gènes entre les variétés, ainsi que les variations au niveau des protéines, qui pourraient être responsables des différences observées dans les dates de floraison.

Chez le pêcher, les gènes *DAM* seraient des facteurs régulant de nombreux processus du développement de la plante, tels que l'arrêt de la croissance saisonnière, la formation de bourgeon terminal (Li *et al.*, 2009) et surtout la dormance (Jimenez *et al.*, 2010). *DAM5* et *DAM6* sont fortement régulés par l'exposition aux températures froides lors de la dormance (Jimenez *et al.*, 2010). Par conséquent, nous avons testé l'expression de leur homologues chez le cerisier, avec celui de *SVP*, au cours de la dormance. Les résultats ont confirmé que leur expression diminue progressivement du début jusqu'à la levée de l'endodormance, phase critique à partir de laquelle ils sont alors totalement réprimés. Cette réduction significative des niveaux de transcriptions, au cours de l'accumulation de froid, est en accord avec les résultats obtenus chez le pêcher (Li *et al.*, 2009; Jimenez *et al.*, 2010), l'abricotier japonais (Ratcliffe *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2011) et ceux trouvés pour *SVP* chez l'abricotier japonais (Yamane *et al.*, 2008). Chez le framboisier, une autre *Rosaceae*, la régulation négative de *SVP* au cours de la dormance a été également signalée (Mazzitelli *et al.*, 2007). Chez le kiwi, l'expression

des gènes *SVP-like* chute également lors de la levée de dormance et complémente les mutants *svp* d'*Arabidopsis*. Ces résultats suggèrent que ces gènes conservent leur fonction entre espèces et sont impliqués dans les mécanismes liés à la dormance et à la floraison du kiwi (Wu *et al.*, 2012). Cependant, contrairement à ce qui a été observé chez le pêcher (Jimenez *et al.*, 2010; Leida *et al.*, 2010), des résultats comparables ont été observées entre la variété à forts besoins en froid ('Regina') et celles à moyens besoins en froid ('Lapins' et 'Garnet') pour l'expression de *DAM5*, *DAM6* et *SVP*. Ces résultats pourraient suggérer que, contrairement au pêcher, et bien qu'ils soient impliqués dans les mécanismes de dormance, les gènes *DAM* ne joueraient pas un rôle important dans la variabilité génétique pour les besoins en froid et la dormance. En conséquence, d'autres gènes pourraient être impliqués dans le contrôle génétique de besoins en froid et la date de floraison.

NUA est l'une des quelques protéines des pores nucléaires conservées entre les animaux, les levures et les plantes. Les mutations *nua* sont associés à une floraison précoce en jours courts et jours longs, et à une expression altérée de plusieurs gènes de floraison tels que *FLC*, *FT* et *SOC1* (Xu *et al.*, 2007b). Cette nucléoporine serait impliquée dans l'exportation des ARNm. Au cours de la levée de dormance, toute la machinerie métabolique et moléculaire est activée et on peut émettre l'hypothèse que les nucléoporines pourraient être essentielles dans la régulation des ARN. Toutefois, aucune variation d'expression n'a été observée pour ce gène candidat dans le temps et entre les variétés.

Le rôle clé du gène FT dans les processus de floraison et de dormance a été étudié chez de nombreuses plantes. Chez le peuplier, FT1 et FT2 seraient impliqués dans de nombreux processus de croissance végétative et reproductive (Hsu *et al.*, 2011). La conservation de la fonction FT a été confirmée par la transformation du prunier avec le gène *Populus FT1* (Srinivasan *et al.*, 2012). Chez le pêcher et le cerisier, un seul homologue de FT a pu être identifié. L'étude de son expression, au cours de la dormance, indique que l'expression de FT croît du début de l'endodormance jusqu'à sa levée (Octobre-Janvier), puis chute jusqu'à la floraison. Ce profil d'expression est similaire pour les quatre génotypes. Une telle augmentation de l'expression au cours de la période hivernale a également été observée pour FT1 chez le peuplier (Hsu *et al.*, 2011), et a été associée à l'initiation florale. Cependant, chez le cerisier, l'induction et l'initiation florale se produiraient à la fin du printemps et au début de l'été, et ne peuvent pas être associées à ce pic durant la période hivernale. De plus, la diminution des niveaux de transcrits paraît plus précoce chez 'Cristobalina' et 'Lapins', par rapport à 'Garnet' et 'Regina'. Bien que 'Cristobalina' soit une variété très précoce pour la

floraison et 'Regina' soit caractérisée par une floraison tardive, les résultats pour 'Lapins' et 'Garnet' nous empêchent de suggérer un lien possible entre l'expression de *FT* et la floraison.

L'analyse d'expression simple ne permet pas de définir clairement l'implication des gènes candidats sélectionnés sur les processus de floraison. D'autres études sont nécessaires, d'une part pour mettre en évidence la régulation épigénétique de *ARP4*, *PIE1* et *EMF2*, d'autre part pour explorer les liens possibles entre les gènes *FT* et *DAM* et leurs relations avec *TFL1* dans le contrôle de la floraison chez les *Rosaceae* (Kurokura *et al.*, 2013).

III. Conclusion et perspectives

La floraison est un mécanisme complexe, crucial dans la vie de la plante. Les résultats obtenus au cours de ce travail mettent en évidence une forte implication des besoins en froid dans la date de floraison, et confirment la régulation négative des gènes *DAM*, gènes clés de la dormance et donc de la répression florale. La co-localisation de gènes candidats impliqués dans les mécanismes épigénétiques avec un QTL d'effet majeur peut suggérer l'implication de mécanismes épigénétiques dans la réponse de la floraison à la température chez le cerisier. Ces mécanismes ont été mis en évidence chez d'autres pérennes comme le peuplier ou le pêcher (Ríos *et al.*, 2014).

La détection de QTL a permis de déterminer des régions génomiques importantes dans la date de floraison et des besoins en froid sur les groupes de liaison 1 et 4. Ces régions ont été retrouvées chez de nombreux *Prunus* tels que l'abricotier, l'amandier ou le pêcher. Nos résultats ont montré pour la date de floraison et les besoins en froid une grande stabilité dans la détection de QTL et une forte corrélation entre ces caractères ce qui suggère une grande implication des besoins en froid sur la date de floraison. En revanche, l'étude des besoins en chaud n'a pas permis de mettre en évidence une région du génome impliquée de façon stable dans le contrôle de ce caractère. Il est possible que ce caractère soit très sensible à l'environnement et que son effet sur la date de floraison soit mineur en comparaison aux besoins en froid. Le développement de nouvelles techniques et analyses plus fines pour identifier les différentes étapes du cycle phénologique du cerisier, en particulier le début de l'ecodormance, ainsi que l'optimisation du phénotypage des besoins en chaud pourraient permettre de mieux définir ce caractère, d'avoir une détection de QTL plus précise, et ainsi de mieux caractériser son rôle dans la floraison. De plus, l'élargissement des descendances, ainsi que l'établissement de descendances aux parents plus contrastés pour ces caractères d'études

(par exemple, un croisement 'Regina' × 'Cristobalina') pourraient permettre de préciser et d'affiner nos résultats. Concernant le premier point, la descendance 'Regina' × 'Garnet' a été récemment élargie et plus de 1400 hybrides ont été plantés sur le terrain en 2012. Toutefois si une faible héritabilité pour les besoins en chaud est confirmée, aucun QTL stable ne pourra être identifié.

Actuellement, une étude multi-site est en cours sur la descendance $R \times L$ afin d'observer l'interaction génotype \times environnement sur la détection QTL de caractères d'intérêt agronomique (van Eeuwijk *et al.*, 2010). La descendance a été implantée sur quatre sites : Bordeaux (France), Nîmes (France), Maribor (Slovénie) et Murcie (Espagne) et le sera bientôt sur deux autres sites : Kent (Grande-Bretagne) et Palerme (Italie).

L'analyse de gènes impliqués dans la floraison a permis de sélectionner un certain nombre des gènes candidats « prometteurs » dont la majorité est impliquée dans la réponse à la température. Ces résultats ont été en partie confirmés par l'analyse préliminaire du RNAseq et des études de génétique d'association. Les gènes tels que les gènes *DAM*, *ARP4* et *EMF2* ont tout particulièrement retenu notre attention pour leur implication dans la réponse de la floraison à la température et dans les mécanismes épigénétiques. Ces gènes feront l'objet d'études plus poussées. L'exploitation plus détaillée des outils, RNAseq et GWAS, leur optimisation et l'amélioration des données de RNAseq par l'ajout de points permettront de dégager de nouveaux axes de recherche en mettant en évidence d'autres gènes candidats possibles. De plus, des études d'eQTL (expression quantitative trait loci), combinées à nos analyses QTL classiques, devraient permettre de déterminer avec plus de précision les mécanismes de régulation de nos gènes candidats impliqués dans la floraison.

Ce travail de thèse a permis d'accéder à de nouveaux objectifs de recherche comme l'étude des mécanismes épigénétiques et notamment une étude approfondie de nos gènes candidats « prometteurs » (*DAM*, *ARP4*, *PIE1*, *EMF2*...). En effet, l'importance de ces mécanismes dans la floraison, en particulier la modification des histones en réponse à la température au cours de la dormance, a été mise en évidence chez des espèces modèles telles que le pêcher. Des études épigénétiques seront menées pour analyser les modifications de la chromatine et des histones dans des bourgeons dormants de cerisier. Cependant, ces études d'épigénétique nécessitent, d'une part, l'optimisation des protocoles d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) sur les bourgeons de cerisier et, d'autre part, la connaissance du génome du cerisier doux. Un génome du cerisier est en cours de développement par le « Sweet cherry consortium » de l'université de Washington à partir de la variété 'Stella'. Cette variété n'étant pas homozygote, des difficultés dans l'assemblage de la séquence complète sont à envisager.

Pour cette raison, une réflexion est en cours, pour le séquençage à partir de tissu haploïde d'une autre variété, Regina.

Avec le développement de nouveaux outils tel qu'un génome complet du cerisier, les études de nos gènes candidats et des profils épigénétiques de bourgeons dormants devraient apporter de nouvelles réponses quant au déterminisme moléculaire et génétique de la floraison du cerisier doux.

A long terme, ces données ainsi que celles des études à venir permettront le développement de nouveaux marqueurs moléculaires qui seront intégrés au programme de sélection assisté par marqueurs permettant l'obtention de nouveaux génotypes mieux adaptés aux futures conditions climatiques.

Bibliographie

Agreste Primeur N 2012. Exploitations arboricoles et vergers - Recensement agricole 2010.

Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, Yoo SY, Henz SR, Brady RL, Weigel D. 2006. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. *Embo Journal* **25**(3): 605-614.

Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P, Kay SA. 2001. Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**(5531): 880-883.

Albani MC, Coupland G 2010. Chapter Eleven - Comparative Analysis of Flowering in Annual and Perennial Plants. In: Marja CPT ed. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press, 323-348.

Alburquerque N, García-Montiel F, Carrillo A, Burgos L. 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany* **64**(2): 162-170.

Alexandre CM, Hennig L. 2008. FLC or not FLC: the other side of vernalization. Journal of Experimental Botany 59(6): 1127-1135.

Alkio M, Jonas U, Declercq M, Van Nocker S, Knoche M. 2014. Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. *Horticulture Research* 1.

Alkio M, Jonas U, Sprink T, van Nocker S, Knoche M. 2012. Identification of putative candidate genes involved in cuticle formation in *Prunus avium* (sweet cherry) fruit. *Annals of Botany* **110**(1): 101-112.

Amasino R. 2009. Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biology* **10**(7).

Amasino R. 2010. Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal* 61(6): 1001-1013.

Anderson JL, Richardson EA. 1986. Validation of chill unit and flower bud phenology models for "Montmorency" sour cherry. *Acta Horticulturae* 184: 71-78.

Anderson JL, Seeley SD. 1993. Bloom delay in deciduous fruits. Horticultural Reviews 15: 97-144.

Andres F, Coupland G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet* 13(9): 627-639.

Andrés F, Porri A, Torti S, Mateos J, Romera-Branchat M, García-Martínez JL, Fornara F, Gregis V, Kater MM, Coupland G. 2014. SHORT VEGETATIVE PHASE reduces gibberellin biosynthesis at the Arabidopsis shoot apex to regulate the floral transition. Proceedings of the National Academy of Sciences 111(26): E2760-E2769.

AOP Cerises 2014. Les Bassins de Production. AOP Cerises de France: <u>http://www.cerises-de-france.fr/1.cfm?p=412-les-varietes-de-cerise</u>.

Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9(3): 208-218.

Aubert D, Chen L, Moon YH, Martin D, Castle LA, Yang CH, Sung ZR. 2001. *EMF1*, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**(8): 1865-1875.

Baggiolini M. 1952. Stade repères du pecher. *Revue Romande d'Agriculture, Viticulture et Arboriculture* **4**: 29.

 Bai S, Saito T, Sakamoto D, Ito A, Fujii H, Moriguchi T. 2013. Transcriptome analysis of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) flower buds transitioning through endodormancy. *Plant Cell Physiol* 54(7): 1132-1151.

Baker RGV, McGowan SA. 2014. Periodicities in mean sea-level fluctuations and climate change proxies: Lessons from the modelling for coastal management. *Ocean & Coastal Management* 98(0): 187-201.

Balandier P, Bonhomme M, Rageau R, Capitan F, Parisot E. 1993. Leaf bud endodormancy release in peach trees: evaluation of temperature models in temperate and tropical climates. *Agricultural and Forest Meteorology* **67**(1-2): 95-113.

Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D. 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *Plos Genetics* 2(7): 980-989.

- Balbontin C, Ayala H, Rubilar J, Cote J, Figueroa CR. 2014. Transcriptional analysis of cell wall and cuticle related genes during fruit development of two sweet cherry cultivars with contrasting levels of cracking tolerance. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74(2): 162-169.
- **Bangerth KF. 2009.** Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: Similarities and discrepancies with annual/biennial plants and the involvement of plant hormones. *Scientia Horticulturae* **122**(2): 153-163.
- Banno K, Hayashi S, Tanabe K. 1985a. Effects of sadh and shoot-bending on flower bud formation, nutrient components and endogenous growth-regulators in japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **53**(4): 365-376.
- Banno K, Hayashi S, Tanabe K. 1985b. Relationships between flower bud formation and endogenous growth-regulators in japanese pear cultivars (*Pyrus serotina* Rehd.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 54(1): 15-25.
- Barakat A, Sriram A, Park J, Zhebentyayeva T, Main D, Abbott A. 2012. Genome wide identification of chilling responsive microRNAs in *Prunus persica*. *Bmc Genomics* **13**: 481.
- **Bargioni G, Saunier R, Claverie J. 1998.** L'amélioration génétique du cerisier. 1ère partie. *Arboriculture Fruitiere* **516**: 39-44.
- Barnuud NN, Zerihun A, Gibberd M, Bates B. 2014a. Berry composition and climate: responses and empirical models. *International Journal of Biometeorology* **58**(6): 1207-1223.
- **Barnuud NN, Zerihun A, Mpelasoka F, Gibberd M, Bates B. 2014b.** Responses of grape berry anthocyanin and titratable acidity to the projected climate change across the Western Australian wine regions. *International Journal of Biometeorology* **58**(6): 1279-1293.
- Barros PM, Goncalves N, Saibo NJM, Margarida Oliveira M. 2012. Cold acclimation and floral development in almond bud break: insights into the regulatory pathways. *J Exp Bot* 63(12): 4585-4596.
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* **427**(6970): 164-167.
- Battey NH, Tooke F. 2002. Molecular control and variation in the floral transition. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(1): 62-68.
- Beavis WD 1998. QTL analyses: Power, precision and accuracy In: Paterson AH ed. *Molecular analysis* of complex traits. Boca Raton, FL: CRC Press
- Bernier G, Perilleux C. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* **3**(1): 3-16.
- Bielenberg DG, Wang Y, Li ZG, Zhebentyayeva T, Fan SH, Reighard GL, Scorza R, Abbott AG. 2008. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach *Prunus persica* (L.) Batsch reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics & Genomes* 4(3): 495-507.
- Blazquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D. 1998. *Gibberellins* promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* **10**(5): 791-800.
- Bomblies K, Wang RL, Ambrose BA, Schmidt RJ, Meeley RB, Doebley J. 2003. Duplicate *FLORICAULA/LEAFY* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development* **130**(11): 2385-2395.
- **Borzan Z. 2001.** *Tree and Shrub Names in Latin, Croatian, English, and German, with synonyms.* Zagreb, Croatia: University of Zagreb.
- **Boskovic R, Tobutt KR. 1998.** Inheritance and linkage relationships of isoenzymes in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* **103**(3): 273-286.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16: S18-S31.
- Boss PK, Thomas MR. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**(6883): 847-850.
- Cabrera A, Kozik A, Howad W, Arus P, Iezzoni AF, van der Knaap E. 2009. Development and bin mapping of a Rosaceae Conserved Ortholog Set (COS) of markers. *Bmc Genomics* **10**.
- Cabrera A, Rosyara U, De Franceschi P, Sebolt A, Sooriyapathirana S, Dirlewanger E, Quero-García J, Schuster M, Iezzoni A, van der Knaap E. 2012. Rosaceae conserved orthologous sequences

marker polymorphism in sweet cherry germplasm and construction of a SNP-based map. *Tree Genetics & Genomes* **8**(2): 237-247.

- Campoy J, Le Dantec L, Barreneche T, Dirlewanger E, Quero-García J. 2014. New Insights into Fruit Firmness and Weight Control in Sweet Cherry. *Plant Molecular Biology Reporter*: 1-14.
- Campoy JA, Ruiz D, Allderman L, Cook N, Egea J. 2012. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). *European Journal of Agronomy* 37(1): 43-55.
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J. 2011a. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae* 130(2): 357-372.
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J, Rees DJG, Celton JM, Martinez-Gomez P. 2011b. Inheritance of Flowering Time in Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Analysis of Linked Quantitative Trait Loci (QTLs) using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 29(2): 404-410.
- **Cannell MGR, Smith RI. 1986.** Climatic warming, spring budburst and frost damage on trees. *Journal of Applied Ecology* **23**(1): 177-191.
- Cao R, Wang LJ, Wang HB, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* 298(5595): 1039-1043.
- Capovilla G, Schmid M, Posé D. 2014. Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*.
- Carrasco B, Meisel L, Gebauer M, Gonzalez RG, Silva H. 2013. Breeding in peach, cherry and plum: from a tissue culture, genetic, transcriptomic and genomic perspective. *Biological Research* 46(3): 219-230.
- Castède S, Campoy JA, Quero-García J, Le Dantec L, Lafargue M, Barreneche T, Wenden B, Dirlewanger E. 2014. Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytologist* 202(2): 703-715.
- Celton JM, Martinez S, Jammes MJ, Bechti A, Salvi S, Legave JM, Costes E. 2011. Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes. *New Phytologist* 192(2): 378-392.
- Chandler J, Wilson A, Dean C. 1996. *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant Journal* 10(4): 637-644.
- Charlot G 2008. « Changements climatiques, quelles adaptations en fruits ». Balandran: Ctifl.
- Chmielewski FM, Rotzer T. 2001. Response of tree phenology to climate change across Europe. Agricultural and Forest Meteorology 108(2): 101-112.
- Choi K, Kim S, Kim SY, Kim M, Hyun Y, Lee H, Choe S, Kim SG, Michaels S, Lee I. 2005. *SUPPRESSOR* OF FRIGIDA 3 encodes a nuclear ACTIN-RELATED PROTEIN 6 required for floral repression in Arabidopsis. Plant Cell **17**(10): 2647-2660.
- Choi K, Park C, Lee J, Oh M, Noh B, Lee I. 2007. *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* **134**(10): 1931-1941.
- **Clarke JB, Sargent DJ, Boskovic RI, Belaj A, Tobutt KR. 2009.** A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* 'Napoleon' x *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers. *Tree Genetics & Genomes* **5**(1): 41-51.
- **Clarke JH, Dean C. 1994.** Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* **242**(1): 81-89.
- Collins M, Knutti R, Arblaster J, Dufresne J-L, Fichefet T, Friedlingstein P, Gao X, Gutowski WJ, Johns T, Krinner G, Shongwe M, Tebaldi C, Weaver AJ, Wehner M 2013. Long-term Climate Change: Projections, Com-mitments and Irreversibility. In: Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM eds. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.

- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18): 3674-3676.
- **Conti L, Bradley D. 2007.** *TERMINAL FLOWER 1* is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *The Plant Cell Online* **19**(3): 767-778.
- **Cooke JEK, Eriksson ME, Junttila O. 2012.** The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell and Environment* **35**(10): 1707-1728.
- **Couvillon GA, Erez A. 1985.** Influence of Prolonged Exposure to Chilling Temperatures on Bud Break and Heat Requirement for Bloom of Several Fruit Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**(1): 47-50.
- Danilevskaya ON, Meng X, Hou Z, Ananiev EV, Simmons CR. 2008. A genomic and expression compendium of the expanded *PEBP* gene family from maize. *Plant Physiology* **146**(1): 250-264.
- Daviere J-M, Achard P. 2013. Gibberellin signaling in plants. Development 140(6): 1147-1151.
- Davies JK, Jensen E, Junttila O, Rivier L, Crozier A. 1985. Identification of endogenous gibberellins from Salix pentandra. Plant Physiology **78**(3): 473-476.
- De Candolle A. 1883. Origine des plantes cultivées Marseille: Ed Jeanne Lafitte.
- **De Cuyper B, Sonneveld T, Tobutt KR. 2005.** Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology* **14**(4): 945-955.
- **De Lucia F, Crevillen P, Jones AME, Greb T, Dean C. 2008.** A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(44): 16831-16836.
- **De Nettancourt D. 2001.** *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Berlin: Springer-Verlag.
- **Deal RB, Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB. 2005.** The nuclear actin-related protein *ARP6* is a pleiotropic developmental regulator required for the maintenance of *FLOWERING LOCUS C* expression and repression of flowering in *Arabidopsis. Plant Cell* **17**(10): 2633-2646.
- **Deal RB, Topp CN, McKinney EC, Meagher RB. 2007.** Repression of flowering in *Arabidopsis* requires activation of *FLOWERING LOCUS C* expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell* **19**(1): 74-83.
- Dickson EE, Arumuganathan K, Kresovich S, Doyle JJ. 1992. Nuclear DNA Content Variation within the *Rosaceae*. American Journal of Botany **79**(9): 1081-1086.
- Dirlewanger E, Claverie J, Wünsch A, Iezzoni AF 2007. Cherry. In: Kole C ed. *Fruits and Nuts*: Springer Berlin Heidelberg, 103-118.
- Dirlewanger E, Cosson P, Howad W, Capdeville G, Bosselut N, Claverie M, Voisin R, Poizat C, Lafargue B, Baron O, Laigret F, Kleinhentz M, Arus P, Esmenjaud D. 2004a. Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid - location of root-knot nematode resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics* **109**(4): 827-838.
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Caldere F, Cosson P, Howad W, Arus P. 2004b. Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(26): 9891-9896.
- Dirlewanger E, Quero-García J, Le Dantec L, Lambert P, Ruiz D, Dondini L, Illa E, Quilot-Turion B, Audergon JM, Tartarini S, Letourmy P, Arus P. 2012. Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity* **109**(5): 280-292.
- **Domergue M, Legave JM, Calleja M, Moutier N, Brisson N, Seguin B. 2004.** Climate warming and consequences for flowering. *Arboriculture Fruitiere*(578): 27-33.
- Dondini L, Lain O, Geuna F, Banfi R, Gaiotti F, Tartarini S, Bassi D, Testolin R. 2007. Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* maps. *Tree Genetics & Genomes* **3**(3): 239-249.
- **Dore MHI. 2005.** Climate change and changes in global precipitation patterns: What do we know? *Environment International* **31**(8): 1167-1181.

- Edge-Garza D, Rowland T, Konishi B, Brutcher L, Evans K, Peace C 2012. "Quality control improves resource savings in routine marker-assisted seedling selection for the Washington apple breeding program". 6 th Rosaceous Genomics Conference. Mezzocorona (Trento), Italy. Poster.
- **Egea J, Ortega E, Martinez-Gomez P, Dicenta F. 2003.** Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany* **50**(1): 79-85.
- Fan S, Bielenberg DG, Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Okie WR, Holland D, Abbott AG. 2010. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). New Phytologist 185(4): 917-930.
- FAOSTAT 2014. Production de cerises: <u>http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E</u>.
- **Fishman S, Erez A, Couvillon GA. 1987.** The Temperature-Dependence of Dormancy Breaking in Plants - Mathematical-Analysis of A 2-Step Model Involving A Cooperative Transition. *Journal of Theoretical Biology* **124**(4): 473-483.
- **Fogelmark K, Troein C. 2014.** Rethinking Transcriptional Activation in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *PLoS Comput Biol* **10**(7): e1003705.
- **Foster T, Kirk C, Jones WT, Allan AC, Espley R, Karunairetnam S, Rakonjac J. 2007.** Characterisation of the DELLA subfamily in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Tree Genetics & Genomes* **3**(3): 187-197.
- **Galvão VC, Schmid M 2014.** Chapter Three Regulation of Flowering by Endogenous Signals. In: Fabio F ed. *Advances in Botanical Research*: Academic Press, 63-102.
- Gazzani S, Gendall AR, Lister C, Dean C. 2003. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiology* **132**(2): 1107-1114.
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C. 2001. The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. Cell 107(4): 525-535.
- Geraldo N, Baeurle I, Kidou S-i, Hu X, Dean C. 2009. FRIGIDA Delays Flowering in Arabidopsis via a Cotranscriptional Mechanism Involving Direct Interaction with the Nuclear Cap-Binding Complex. Plant Physiology 150(3): 1611-1618.
- Ghelardini L, Santini A, Black-Samuelsson S, Myking T, Falusi M. 2010. Bud dormancy release in elm (Ulmus spp.) clones-a case study of photoperiod and temperature responses. *Tree Physiology* 30(2): 264-274.
- **Gouws A, Steyn WJ. 2014.** The effect of temperature, region and season on red colour development in apple peel under constant irradiance. *Scientia Horticulturae* **173**: 79-85.
- **Greb T, Mylne JS, Crevillen P, Geraldo N, An H, Gendall AR, Dean C. 2007.** The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis FLC. Current Biology* **17**(1): 73-78.
- **Grennan AK. 2006.** Variations on a theme. Regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**(2): 399-400.
- Guitton B, Kelner J-J, Velasco R, Gardiner SE, Chagne D, Costes E. 2012. Genetic control of biennial bearing in apple. *Journal of Experimental Botany* 63(1): 131-149.
- **Guttridge C 1985.** *Fragaria* x *ananassa*. In: Halevy A ed. *Handbook of flowering*. Boca Raton, FL: CRC Press, 16-23.
- Han H-H, Coutand C, Cochard H, Trottier C, Lauri P-E. 2007. Effects of shoot bending on lateral fate and hydraulics: invariant and changing traits across five apple genotypes. *Journal of Experimental Botany* 58(13): 3537-3547.
- Hanninen H, Tanino K. 2011. Tree seasonality in a warming climate. *Trends in Plant Science* 16(8): 412-416.
- Harlan JR. 1995. Agricultural origins and crop domestication in the Mediterranean region. *Diversity* 11(1/2): 14-16.
- Harmer SL 2009. The Circadian System in Higher Plants. Annual Review of Plant Biology, 357-377.
- Hartmann U, Hohmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P. 2000. Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **21**(4): 351-360.
- He Y, Michaels SD, Amasino RM. 2003. Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in *Arabidopsis. Science* 302(5651): 1751-1754.

- **He YH, Doyle MR, Amasino RM. 2004.** PAF1-complex-mediated histone methylation of *FLOWERING LOCUS C* chromatin required for the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis. Genes & Development* **18**(22): 2774-2784.
- Hedley PE, Russell JR, Jorgensen L, Gordon S, Morris JA, Hackett CA, Cardle L, Brennan R. 2010.
 Candidate genes associated with bud dormancy release in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.).
 BMC Plant Biology 10.
- Hedrick UP, Howe GH, Taylor OM, Tubergen CB, Wellington R 1915. The cherries of New York. Albany: J. B. Lyon company, state printers.
- **Heide OM. 2008.** Interaction of photoperiod and temperature in the control of growth and dormancy of *Prunus* species. *Scientia Horticulturae* **115**(3): 309-314.
- Heide OM. 2011. Temperature rather than photoperiod controls growth cessation and dormancy in *Sorbus* species. *Journal of Experimental Botany* **62**(15): 5397-5404.
- **Heide OM, Prestrud AK. 2005.** Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiology* **25**(1): 109-114.
- Henderson IR, Shindo C, Dean C. 2003. The need for winter in the switch to flowering. *Annual Review* of Genetics **37**: 371-392.
- **Heo JB, Sung S. 2011.** Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA. *Science* **331**(6013): 76-79.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405(6789): 907-913.
- **Higgins JA, Bailey PC, Laurie DA. 2010.** Comparative Genomics of Flowering Time Pathways Using *Brachypodium distachyon* as a Model for the Temperate Grasses. *PLoS ONE* **5**(4): e10065.
- Horvath D. 2009. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science* **177**(6): 523-531.
- Horvath DP, Chao WS, Suttle JC, Thimmapuram J, Anderson JV. 2008. Transcriptome analysis identifies novel responses and potential regulatory genes involved in seasonal dormancy transitions of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Bmc Genomics* **9**: 536.
- Horvath DP, Sung S, Kim D, Chao W, Anderson J. 2010. Characterization, expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX genes from leafy spurge. Plant Mol Biol 73(1-2): 169-179.
- Hsu C-Y, Adams JP, Kim H, No K, Ma C, Strauss SH, Drnevich J, Vandervelde L, Ellis JD, Rice BM, Wickett N, Gunter LE, Tuskan GA, Brunner AM, Page GP, Barakat A, Carlson JE, dePamphilis CW, Luthe DS, Yuceer C. 2011. FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(26): 10756-10761.
- Hsu C-Y, Liu Y, Luthe DS, Yuceer C. 2006. *Poplar FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* **18**(8): 1846-1861.
- Hsu PY, Harmer SL. 2014. Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends in Plant Science* 19(4): 240-249.
- **Iezzoni AF, Schmidt H, Albertini A 1990.** Cherries (*Prunus*). In: Moore J, Bellington JJ eds. *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. Wageningen, The Netherlands: International Society of Horticultural Science, 109–173.
- Imaizumi T, Kay SA. 2006. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science* **11**(11): 550-558.
- IPCC. 2007. Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL eds. *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*: Cambridge, UK & New York,NY, USA: Cambridge University Press.
- **IPCC 2013.** Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 1535.
- IPCC 2014. Summary for policymakers. In: Field CB, Barros VR, Dokken DJ, Mach KJ, Mastrandrea MD, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, Kissel ES, Levy AN, MacCracken S, Mastrandrea PR, White LL eds. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to

the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 1 - 32.

- Irannezhad M, Marttila H, Klove B. 2014. Long-term variations and trends in precipitation in Finland. International Journal of Climatology 34(10): 3139-3153.
- Jang S, Torti S, Coupland G. 2009. Genetic and spatial interactions between *FT*, *TSF* and *SVP* during the early stages of floral induction in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **60**(4): 614-625.
- Jiang D, Yang W, He Y, Amasino RM. 2007. *Arabidopsis relatives of the Human Lysine-Specific Demethylase1* repress the expression of *FWA* and *FLOWERING LOCUS C* and thus promote the floral transition. *The Plant Cell Online* **19**(10): 2975-2987.
- Jiang DH, Wang YQ, Wang YZ, He YH. 2008. Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the Arabidopsis Polycomb Repressive Complex 2 Components. *PLoS ONE* 3(10).
- Jimenez S, Lawton-Rauh A, Reighard G, Abbott A, Bielenberg D. 2009. Phylogenetic analysis and molecular evolution of the dormancy associated *MADS-box* genes from peach. *BMC Plant Biology* 9(1): 81.
- Jimenez S, Reighard GL, Bielenberg DG. 2010. Gene expression of *DAM5* and *DAM6* is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Molecular Biology* **73**(1-2): 157-167.
- Jimenez S, Reighard GL, Bielenberg DG 2012. Peach Dormancy Associated MADS-Box Gene Expression during Natural Chilling Accumulation. In: Girona J, Marsal J eds. Vii International Peach Symposium, 161-167.
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C. 2000. Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290(5490): 344-347.
- Joobeur T, Viruel MA, de Vicente MC, Jauregui B, Ballester J, Dettori MT, Verde I, Truco MJ, Messeguer R, Batlle I, Quarta R, Dirlewanger E, Arus P. 1998. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond x peach F2 progeny. *Theoretical and Applied Genetics* 97(7): 1034-1041.
- Joughin I, Smith BE, Medley B. 2014. Marine Ice Sheet Collapse Potentially Under Way for the Thwaites Glacier Basin, West Antarctica. *Science* **344**(6185): 735-738.
- Jung C, Mueller AE. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science* 14(10): 563-573.
- Kandasamy MK, Deal RB, McKinney EC, Meagher RB. 2005. Silencing the nuclear actin-related protein *AtARP4* in *Arabidopsis* has multiple effects on plant development, including early flowering and delayed floral senescence. *Plant Journal* **41**(6): 845-858.
- **Kappel F, MacDonald R 2000.** Advanced sweet cherry selections available for evaluation from the agriculture and agri-food Canada breeding program. In: Geibel M, Fischer M, Fischer C eds. *Proceedings of the Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Vols 1 and 2*, 745-748.
- Kawamura K, Oyant LH-S, Crespel L, Thouroude T, Lalanne D, Foucher F. 2011. Quantitative trait loci for flowering time and inflorescence architecture in rose. *Theoretical and Applied Genetics* 122(4): 661-675.
- Khan MRG, Ai X-Y, Zhang J-Z. 2014. Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 5(3): 347-359.
- **Kieffer M, Davies B. 2001.** Developmental programmes in floral organ formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **12**(5): 373-380.
- Kim D-H, Doyle MR, Sung S, Amasino RM. 2009a. Vernalization: Winter and the Timing of Flowering in Plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology **25**: 277-299.
- **Kim D-H, Doyle MR, Sung S, Amasino RM 2009b.** Vernalization: Winter and the Timing of Flowering in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Palo Alto: Annual Reviews, 277-299.
- Kirtman B, Power SB, Adedoyin JA, Boer GJ, Bojariu R, Camilloni I, Doblas-Reyes FJ, Fiore AM, Kimoto M, Meehl GA, Prather M, Sarr A, Schär C, Sutton R, van Oldenborgh GJ, Vecchi G, Wang HJ 2013. Near-term Climate Change: Projections and Predictability. *Climate Change* 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment

Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.

- Klagges C, Campoy JA, Quero-García J, Guzman A, Mansur L, Gratacos E, Silva H, Rosyara UR, Iezzoni A, Meisel LA, Dirlewanger E. 2013. Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-specific progenies of commercial cultivars. *PLoS ONE* 8(1): e54743-e54743.
- Knott JE. 1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci 31: 152-154.
- Ko J-H, Mitina I, Tamada Y, Hyun Y, Choi Y, Amasino RM, Noh B, Noh Y-S. 2010. Growth habit determination by the balance of histone methylation activities in *Arabidopsis*. *Embo Journal* 29(18): 3208-3215.
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286(5446): 1960-1962.
- Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J. 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *Plos Biology* **2**(5): 587-599.
- Koepke T, Schaeffer S, Harper A, Dicenta F, Edwards M, Henry RJ, Møller BL, Meisel L, Oraguzie N, Silva H, Sánchez-Pérez R, Dhingra A. 2013. Comparative genomics analysis in *Prunoideae* to identify biologically relevant polymorphisms. *Plant Biotechnology Journal* 11(7): 883-893.
- Koskela EA, Mouhu K, Albani MC, Kurokura T, Rantanen M, Sargent DJ, Battey NH, Coupland G, Elomaa P, Hytonen T. 2012. Mutation in *TERMINAL FLOWER1* Reverses the Photoperiodic Requirement for Flowering in the Wild Strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Physiology* **159**(3): 1043-1054.
- Kotoda N, Hayashi H, Suzuki M, Igarashi M, Hatsuyama Y, Kidou S-i, Igasaki T, Nishiguchi M, Yano K, Shimizu T, Takahashi S, Iwanami H, Moriya S, Abe K. 2010. Molecular Characterization of FLOWERING LOCUS T-Like Genes of Apple (Malus domestica Borkh.). Plant and Cell Physiology 51(4): 561-575.
- Krizek BA, Fletcher JC. 2005. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6(9): 688-698.
- Kumar SV, Wigge PA. 2010. H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. Cell 140(1): 136-147.
- **Kuroda H, Sagisaka S. 2001.** Ultrastructural changes in apical meristem cells of apple flower buds associated with dormancy and cold tolerance. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **70**(5): 553-560.
- **Kurokura T, Mimida N, Battey NH, Hytönen T. 2013.** The regulation of seasonal flowering in the *Rosaceae. Journal of Experimental Botany* **64**(14): 4131-4141.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & Development* **16**(22): 2893-2905.
- Lafon-Placette C, Faivre-Rampant P, Delaunay A, Street N, Brignolas F, Maury S. 2013. Methylome of DNase I sensitive chromatin in *Populus trichocarpa* shoot apical meristematic cells: a simplified approach revealing characteristics of gene-body DNA methylation in open chromatin state. *New Phytologist* **197**(2): 416-430.
- Lagercrantz U. 2009. At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *Journal of Experimental Botany* **60**(9): 2501-2515.
- Lambert P, Faurobert M, Pelpoir E, Moreau K, Poessel JL, Audergon JM 2004. Comparative mapping of Prunus armeniaca, Prunus cerasifera x Prunus armeniaca and Prunus reference map. In: Laurens F, Evans K eds. Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Vols 1 and 2, 91-94.
- Lang GA. 1987. Dormancy a new universal terminology. *Hortscience* 22(5): 817-820.
- Lau On S, Huang X, Charron J-B, Lee J-H, Li G, Deng Xing W. 2011. Interaction of *Arabidopsis DET1* with *CCA1* and *LHY* in Mediating Transcriptional Repression in the Plant Circadian Clock. *Molecular Cell* **43**(5): 703-712.
- Lavee S. 1973. Dormancy and bud break in warm climates; considerations of growth regulator involvement. *Acta Horticulturae*(34): 225-234.

- Lawson EJR, Poethig RS. 1995. Shoot development in plants time for a change. *Trends in Genetics* 11(7): 263-268.
- Le Dantec L, Quero-García J, Dirlewanger E 2012. De novo assembly of sweet cherry (*Prunus avium*) transcriptome from 454 sequencing data. Mezzocorona (Trento), Italy: 6th Rosaceous Genomics Conference. Poster.
- Le Quere C, Canadell JG, Ciais P, Dhakal S, Patwardhan A, Raupach MR, Young OR. 2010. An International Carbon Office to assist policy-based science. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 2(4): 297-300.
- Lee H, Suh S-S, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim S-G, Lee JS, Kwon YM, Lee I. 2000. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 14(18): 2366-2376.
- Lee JH, Yoo SJ, Park SH, Hwang I, Lee JS, Ahn JH. 2007. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 21(4): 397-402.
- Legave JM 2008. La conséquence du réchauffement global sur la floraison des arbres fruitiers. Bellegarde, France Ctifl. Présentation orale.
- Legave JM, Farrera I, Almeras T, Calleja M. 2008. Selecting models of apple flowering time and understanding how global warming has had an impact on this trait. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83(1): 76-84.
- Leida C, Conejero A, Arbona V, Gómez-Cadenas A, Llácer G, Badenes ML, Ríos G. 2012a. Chilling-Dependent Release of Seed and Bud Dormancy in Peach Associates to Common Changes in Gene Expression. *PLoS ONE* **7**(5): e35777.
- Leida C, Conesa A, Llacer G, Luisa Badenes M, Rios G. 2012b. Histone modifications and expression of *DAM6* gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner. *New Phytologist* **193**(1): 67-80.
- Leida C, Terol J, Marti G, Agusti M, Llacer G, Luisa Badenes M, Rios G. 2010. Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiology* **30**(5): 655-666.
- Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, Gendall AR, Dean C. 2002. Multiple roles of *Arabidopsis VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science* 297(5579): 243-246.
- Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H. 2008. A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **15**(1): 110-120.
- Li Z, Reighard GL, Abbott AG, Bielenberg DG. 2009. Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [Prunus persica (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. J Exp Bot 60(12): 3521-3530.
- Lichou J, Edin M, Tronel C, Saunier R. 1990. Le cerisier "la cerise de table". Paris: Ctifl.
- **Lifschitz E, Ayre BG, Eshed Y. 2014.** Florigen and anti-florigen a systemic mechanism for coordinating growth and termination in flowering plants. *Frontiers in Plant Science* **5**: 465-465.
- Liljegren SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS, Yanofsky MF. 1999. Interactions among *APETALA1, LEAFY,* and *TERMINAL FLOWER1* Specify Meristem Fate. *The Plant Cell Online* 11(6): 1007-1018.
- Lim MH, Kim J, Kim YS, Chung KS, Seo YH, Lee I, Kim J, Hong CB, Kim HJ, Park CM. 2004. A new *Arabidopsis* gene, *FLK*, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time *via FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell* **16**(3): 731-740.
- Liu C, Xi W, Shen L, Tan C, Yu H. 2009. Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes. Developmental Cell 16(5): 711-722.
- Liu F, Marquardt S, Lister C, Swiezewski S, Dean C. 2010. Targeted 3 ' Processing of Antisense Transcripts Triggers *Arabidopsis FLC* Chromatin Silencing. *Science* **327**(5961): 94-97.
- Lohmann JU, Weigel D. 2002. Building beauty: The genetic control of floral patterning. Developmental Cell 2(2): 135-142.
- Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X. 2011. Arabidopsis REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. Nat Genet 43(7): 715-719.

- **Luedeling E. 2012.** Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. *Scientia Horticulturae* **144**: 218-229.
- Luedeling E, Brown PH. 2011. A global analysis of the comparability of winter chill models for fruit and nut trees. *International Journal of Biometeorology* **55**(3): 411-421.
- Lugli S, Sansavini S 2008. Preliminary Results of a Cherry Rootstock Trial in Vignola, Italy. In: Burak M, Lang GA, Gulen H, Ipek A eds. *Proceedings of the Vth International Cherry Symposium, Vols 1 and 2*, 321-326.
- Marafon AC, Citadin I, do Amarante L, Herter FG, Hawerroth FJ. 2011. Chilling privation during dormancy period and carbohydrate mobilization in Japanese pear trees. *Scientia Agricola* 68(4): 462-468.
- Mathieu J, Yant LJ, Muerdter F, Kuettner F, Schmid M. 2009. Repression of Flowering by the *miR172* Target SMZ. *Plos Biology* **7**(7).
- Mazzitelli L, Hancock RD, Haupt S, Walker PG, Pont SDA, McNicol J, Cardle L, Morris J, Viola R, Brennan R, Hedley PE, Taylor MA. 2007. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. *Journal of Experimental Botany* 58(5): 1035-1045.
- McClung CR, Gutiérrez RA. 2010. Network news: prime time for systems biology of the plant circadian clock. *Current Opinion in Genetics & Development* 20(6): 588-598.
- Measham PF, Quentin AG, MacNair N. 2014. Climate, Winter Chill, and Decision-making in Sweet Cherry Production. *Hortscience* 49(3): 254-259.
- Meier U, Graf H, Hack H, Hess M, Kennel W, Klose R, Mappes D, Seipp D, Stauss R, Streif J, Boom Tvd. 1994. Phenological growth stages of pome fruits (*Malus domestica* Borkh. and *Pyrus communis* L.), stone fruits (*Prunus* species), currants (*Ribes* species) and strawberry (*Fragaria* x ananassa Duch.). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 46(7): 141-153.
- Menzel A. 2000. Trends in phenological phases in Europe between 1951 and 1996. *International Journal of Biometeorology* 44(2): 76-81.
- Michaels SD. 2009. Flowering time regulation produces much fruit. *Current Opinion in Plant Biology* **12**(1): 75-80.
- Michaels SD, Amasino RM. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11(5): 949-956.
- Mimida N, Oshino H, Li J, Zhang C, Takagishi K, Moriya-Tanaka Y, Iwanami H, Honda C, Suzuki A, Komori S, Wada M. 2011a. Effects of the plant growth regulators on expression of *MdTFL1* promoter fused beta-glucuronidase (GUS) reporter gene in apple (*Malus* spp.) tissues *in vitro*. *Plant Biotechnology* 28(5): 503-508.
- Mimida N, Ureshino A, Tanaka N, Shigeta N, Sato N, Moriya-Tanaka Y, Iwanami H, Honda C, Suzuki A, Komori S, Wada M. 2011b. Expression patterns of several floral genes during flower initiation in the apical buds of apple (*Malus x domestica* Borkh.) revealed by *in situ* hybridization. *Plant Cell Reports* **30**(8): 1485-1492.
- Mizuguchi G, Shen XT, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. 2004. ATP-Driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**(5656): 343-348.
- Mohanty A, Martin JP, Aguinagalde I. 2001. A population genetic analysis of chloroplast DNA in wild populations of *Prunus avium* L. in Europe. *Heredity* 87: 421-427.
- Monfreda C, Ramankutty N, Foley JA. 2008. Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000. *Global Biogeochemical Cycles* 22(1).
- Moon YH, Chen L, Pan RL, Chang HS, Zhu T, Maffeo DM, Sung ZR. 2003. *EMF* genes maintain vegetative development by repressing the flower program in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**(3): 681-693.
- Moore TC, Moore JA. 1991. Induction of ent-kaurene biosynthesis by low-temperature in dwarf peas. *Journal of Plant Growth Regulation* **10**(2): 91-95.
- Moreno MA, Adrada R, Aparicio J, Betran JA. 2001. Performance of 'Sunburst' sweet cherry grafted on different rootstocks. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **76**(2): 167-173.
- Moss RH, Edmonds JA, Hibbard KA, Manning MR, Rose SK, van Vuuren DP, Carter TR, Emori S, Kainuma M, Kram T, Meehl GA, Mitchell JFB, Nakicenovic N, Riahi K, Smith SJ, Stouffer RJ,

Thomson AM, Weyant JP, Wilbanks TJ. 2010. The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature* **463**(7282): 747-756.

- Mouhu K, Hytonen T, Folta K, Rantanen M, Paulin L, Auvinen P, Elomaa P. 2009. Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biology* 9.
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G. 2002. Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 14: S111-S130.
- Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila polycomb group repressor complex. *Cell* **111**(2): 197-208.
- Munoz-Fambuena N, Mesejo C, Carmen Gonzalez-Mas M, Iglesias DJ, Primo-Millo E, Agusti M.
 2012. Gibberellic Acid Reduces Flowering Intensity in Sweet Orange *Citrus sinensis* (L.)
 Osbeck by Repressing *CiFT* Gene Expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 31(4): 529-536.
- Nagel DH, Kay SA. 2012. Complexity in the Wiring and Regulation of Plant Circadian Networks. *Current Biology* 22(16): R648-R657.
- Niikawa T, Suzuki T, Ozeki T, Nishigaki T. 2014. Relationship between an air temperature drop in summer and autumn and fruit skin coloring in 'Fuyu' persimmon. *Horticultural Research* (*Japan*) **13**(1): 59-65.
- Noh B, Lee S-H, Kim H-J, Yi G, Shin E-A, Lee M, Jung K-J, Doyle MR, Amasino RM, Noh Y-S. 2004. Divergent Roles of a Pair of Homologous Jumonji/Zinc-Finger–Class Transcription Factor Proteins in the Regulation of *Arabidopsis* Flowering Time. *The Plant Cell Online* **16**(10): 2601-2613.
- **Odo Camps J, Concepcion Ramos M. 2012.** Grape harvest and yield responses to inter-annual changes in temperature and precipitation in an area of north-east Spain with a Mediterranean climate. *International Journal of Biometeorology* **56**(5): 853-864.
- Okie WR, Blackburn B. 2011. Increasing Chilling Reduces Heat Requirement for Floral Budbreak in Peach. *Hortscience* 46(2): 245-252.
- Oliver SN, Deng W, Casao MC, Trevaskis B. 2013. Low temperatures induce rapid changes in chromatin state and transcript levels of the cereal VERNALIZATION1 gene. Journal of Experimental Botany 64(8): 2413-2422.
- Olmstead JW, Sebolt AM, Cabrera A, Sooriyapathirana SS, Hammar S, Iriarte G, Wang D, Chen CY, van der Knaap E, Iezzoni AF. 2008. Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map. *Tree Genetics & Genomes* 4(4): 897-910.
- Olukolu BA, Trainin T, Fan SH, Kole C, Bielenberg DG, Reighard GL, Abbott AG, Holland D. 2009. Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and budbreak in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Genome* **52**(10): 819-828.
- **Oukabli A 2004**. LE CERISIER Une culture de zones d'altitude.In Rural MdlAedD. *BULLETIN MENSUEL D'INFORMATION ET DE LIAISON DU PNTTA*. Maroc: Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture
- Ouzeau G, Déqué M, Jouini M, Planton S, Vautard R, Jouzel J 2014. Scénarios régionalisés : édition 2014 pour la métropole et les régions d'outre-mer. *Le climat de la France au XXIe siècle*: Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie.
- **Parcy F. 2005.** Flowering: a time for integration. *International Journal of Developmental Biology* **49**(5-6): 585-593.
- Pawasut A, Fujishige N, Yamane K, Yamaki Y, Honjo H. 2004. Relationships between chilling and heat requirement for flowering in ornamental peaches. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **73**(6): 519-523.
- Peace C, Bassil N, Main D, Ficklin S, Rosyara UR, Stegmeir T, Sebolt A, Gilmore B, Lawley C, Mockler TC, Bryant DW, Wilhelm L, Iezzoni A. 2012. Development and Evaluation of a Genome-Wide 6K SNP Array for Diploid Sweet Cherry and Tetraploid Sour Cherry. *PLoS ONE* **7**(12).
- Pena L, Martin-Trillo M, Juarez J, Pina JA, Navarro L, Martinez-Zapater JM. 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in *Citrus* reduces their generation time. *Nature Biotechnology* **19**(3): 263-267.

- Perez R, Navarro F, Angeles Sanchez M, Maria Ortiz J, Morales R. 2010. Analysis of agromorphological descriptors to differentiate between duke cherry(*Prunus x gondouinii* (Poit. & Turpin) Rehd.) and its progenitors: sweet cherry (*Prunus avium* L.) and sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Chilean Journal of Agricultural Research **70**(1): 34-49.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Muller-Starck GM, Demesure-Musch B, Palme A, Martin JP, Rendell S, Vendramin GG. 2003. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300(5625): 1563-1565.
- **Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**(9).
- Pien S, Fleury D, Mylne JS, Crevillen P, Inze D, Avramova Z, Dean C, Grossniklaus U. 2008. *ARABIDOPSIS TRITHORAX1* dynamically regulates *FLOWERING LOCUS C* activation *via* histone 3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell* **20**(3): 580-588.
- Pittendrigh CS. 1964. The Entrainment of Circadian Oscillations by Skeleton Photoperiods. *Science* (*New York, N.Y.*) 144(3618): 565-565.
- Porri A, Torti S, Romera-Branchat M, Coupland G. 2012. Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. *Development* 139(12): 2198-2209.
- Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, Kerr M, Robertson KR, Arsenault M, Dickinson TA, Campbell CS. 2007. Phylogeny and classification of *Rosaceae*. *Plant Systematics and Evolution* 266(1-2): 5-43.
- Primack RB, Higuchi H, Miller-Rushing AJ. 2009. The impact of climate change on cherry trees and other species in Japan. *Biological Conservation* **142**(9): 1943-1949.
- Pruneda-Paz JL, Kay SA. 2010. An expanding universe of circadian networks in higher plants. *Trends in Plant Science* **15**(5): 259-265.
- Quero-García J, Campoy JA, Joly J, Tauzin Y, Rosyara UR, Iezzoni A, Dirlewanger E 2012. QTL detection for fruit weight, fruit firmness and fruit cracking tolerance in sweet cherry. San Diego, California, USA: Plant and Animal Genome XX Conference. Poster.
- Quilot B, Wu BH, Kervella J, Genard M, Foulongne M, Moreau K. 2004. QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**(4): 884-897.
- **R_Development_Core_Team 2012**. R: A language and environment for statistical computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Juchaux M, Sakr S, Foucher F. 2012. Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, *RoKSN*, a rose *TFL1* homologue. *Journal of Experimental Botany* **63**(18): 6543-6554.
- Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES. 1999. Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* 126(6): 1109-1120.
- Ratcliffe OJ, Kumimoto RW, Wong BJ, Riechmann JL. 2003. Analysis of the *Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING* Gene Family: *MAF2* Prevents Vernalization by Short Periods of Cold. *The Plant Cell Online* **15**(5): 1159-1169.
- Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL, Riechmann JL. 2001. Regulation of Flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* Homologue. *Plant Physiology* **126**(1): 122-132.
- Raupach MR, Marland G, Ciais P, Le Quere C, Canadell JG, Klepper G, Field CB. 2007. Global and regional drivers of accelerating CO2 emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(24): 10288-10293.
- Raupach MR, Rayner PJ, Paget M. 2010. Regional variations in spatial structure of nightlights, population density and fossil-fuel CO2 emissions. *Energy Policy* **38**(9): 4756-4764.
- Reeves PA, He Y, Schmitz RJ, Amasino RM, Panella LW, Richards CM. 2007. Evolutionary conservation of the *FLOWERING LOCUS C*-mediated vernalization response: Evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* **176**(1): 295-307.
- **Rehder A. 1949.** *Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the Northern Hemisphere.* Jamaica Plain, Mass.,: Arnold Arboretum of Harvard University.

- Reinoso H, Luna V, Pharis RP, Bottini R. 2002. Dormancy in peach (*Prunus persica*) flower buds. V. Anatomy of bud development in relation to phenological stage. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **80**(6): 656-663.
- **Richardson EA, Seeley Schuyler D, Walker David R. 1974.** A model for estimating the completion of rest for "Redhaven" and "Elberta" peach trees. *Hortscience* **1**: 331-332.
- Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernandez-Garcia N, Griffiths J, Powers SJ, Gong F, Linhartova T, Eriksson S, Nilsson O, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. 2008. The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *Plant Journal* **53**(3): 488-504.
- Rinne PLH, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjarvi J, van der Schoot C. 2011. Chilling of Dormant Buds Hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and Recruits GA-Inducible 1,3-beta-Glucanases to Reopen Signal Conduits and Release Dormancy in *Populus*. *Plant Cell* 23(1): 130-146.
- Ríos G, Leida C, Conejero A, Badenes ML. 2014. Epigenetic regulation of bud dormancy events in perennial plants. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- **Robert S 2013**. Etude des déterminants génétiques impliqués dans la production et la qualité de la cerise douce par l'analyse de liaison et initiation des analyses d'association: Master 2, AGROCAMPUS OUEST CFR Rennes. 30.
- Roberts AV, Blake PS, Lewis R, Taylor JM, Dunstan DI. 1999. The effect of gibberellins on flowering in roses. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**(3): 113-119.
- Romeu JF, Monforte AJ, Sanchez G, Granell A, Garcia-Brunton J, Badenes ML, Rios G. 2014. Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC Plant Biology* 14.
- Rosyara UR, Bink M, van de Weg E, Zhang GR, Wang DC, Sebolt A, Dirlewanger E, Quero-García J, Schuster M, Iezzoni AF. 2013. Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry. *Molecular Breeding* **32**(4): 875-887.
- **Ruiz D, Campoy JA, Egea J. 2007.** Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany* **61**(3): 254-263.
- **Ruonala R, Rinne PLH, Kangasjarvi J, van der Schoot C. 2008.** *CENL1* expression in the rib meristem affects stem elongation and the transition to dormancy in *Populus*. *Plant Cell* **20**(1): 59-74.
- Ruttink T, Arend M, Morreel K, Storme V, Rombauts S, Fromm J, Bhalerao R, Boerjan W, Rohde A. **2007.** A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in *poplar*. *Plant Cell* **19**(8): 2370 2390.
- Saintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Pot D, Plomion C, Kremer A. 2004. Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity* **92**(1): 20-30.
- Saito T, Bai S, Ito A, Sakamoto D, Saito T, Ubi BE, Imai T, Moriguchi T. 2013. Expression and genomic structure of the *dormancy-associated MADS box* genes *MADS13* in Japanese pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) that differ in their chilling requirement for endodormancy release. *Tree Physiology* 33(6): 654-667.
- Sanchez-Perez R, Dicenta F, Martinez-Gomez P. 2012. Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. *Tree Genetics & Genomes* 8(2): 379-389.
- Sasaki R, Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Kitamura Y, Akagi T, Tao R. 2011. Functional and expressional analyses of *PmDAM* genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiol* **157**(1): 485-497.
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA, Coupland G. 1998. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**(7): 1219-1229.
- Schmitz RJ, Sung S, Amasino RM. 2008. Histone arginine methylation is required for vernalizationinduced epigenetic silencing of *FLC* in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(2): 411-416.
- Searle I, He YH, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino RA, Coupland G. 2006. The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**(7): 898-912.
- Serrano G, Herrera-Palau R, Romero JM, Serrano A, Coupland G, Valverde F. 2009. *Chlamydomonas CONSTANS* and the Evolution of Plant Photoperiodic Signaling. *Current Biology* **19**(5): 359-368.
- **Sheldon CC, Conn AB, Dennis ES, Peacock WJ. 2002.** Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* **14**(10): 2527-2537.
- Shrestha R, Gómez-Ariza J, Brambilla V, Fornara F. 2014. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Annals of Botany* **114**(7): 1445-1458.
- Silva C, Garcia-Mas J, Sanchez AM, Arus P, Oliveira M. 2005. Looking into flowering time in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb): the candidate gene approach. *Theoretical and Applied Genetics* **110**(5): 959-968.
- Silverstone AL, Chang CW, Krol E, Sun TP. 1997. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **12**(1): 9-19.
- **Simpson GG. 2004.** The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(5): 570-574.
- Simpson GG, Dean C. 2002. Flowering Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time? *Science* 296(5566): 285-289.
- Socquet-Juglard D, Christen D, Devenes G, Gessler C, Duffy B, Patocchi A. 2013. Mapping Architectural, Phenological, and Fruit Quality QTLs in Apricot. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**(2): 387-397.
- **Song YH, Ito S, Imaizumi T. 2013.** Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science* **18**(10): 575-583.
- **Sonsteby A, Heide OM. 2006.** Dormancy relations and flowering of the strawberry cultivars Korona and Elsanta as influenced by photoperiod and temperature. *Scientia Horticulturae* **110**(1): 57-67.
- Sooriyapathirana SS, Khan A, Sebolt AM, Wang DC, Bushakra JM, Lin-Wang K, Allan AC, Gardiner SE, Chagne D, Iezzoni AF. 2010. QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics & Genomes* 6(6): 821-832.
- Srikanth A, Schmid M. 2011. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(12): 2013-2037.
- Srinivasan C, Dardick C, Callahan A, Scorza R. 2012. Plum (*Prunus domestica*) Trees Transformed with *Poplar FT1* Result in Altered Architecture, Dormancy Requirement, and Continuous Flowering. *PLoS ONE* 7(7).
- **Stockinger EJ, Mulinix CA, Long CM, Brettin TS, Iezzoni AF. 1996.** A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *Journal of Heredity* **87**(3): 214-218.
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. Nature 410(6832): 1116-1120.
- **Sung S, Schmitz RJ, Amasino RM. 2006.** A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis. Genes & Development* **20**(23): 3244-3248.
- Sung SB, Amasino RM. 2004a. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(1): 4-10.
- Sung SB, Amasino RM. 2004b. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427(6970): 159-164.
- Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C. 2009. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. *Nature* 462(7274): 799-U122.
- Tamada Y, Yun J-Y, Woo SC, Amasino RM. 2009. ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 Is Required for Methylation of Lysine 4 of Histone H3 and for Transcriptional Activation of FLOWERING LOCUS C. Plant Cell 21(10): 3257-3269.
- Tan F-C, Swain SM. 2006. Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. *Physiologia Plantarum* **128**(1): 8-17.
- **Tao R, lezzoni AF. 2010.** The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae* **124**(4): 423-433.

- **Tavaud M. 2002.** Diversité génétique du cerisier doux (Prunus avium L.) sur son aire de répartition : comparaison avec ses espèces apparentées (P. cerasus et P. x gondouinii) et son compartiment sauvage. ENSA Montpellier.
- Thomas B, Vince-Prue D. 1997. Photoperiodism in plants. London: Academic Press.
- **Thomas D, Hayman P, James P 2012**. Understanding and managing the risks and opportunities from climate change on Cherry production. Adelaide, South Australia: South Australian Research and Development Institute (Sustainable Systems).
- Tong ZG, Qu SC, Zhang JY, Wang F, Tao JM, Gao ZH, Zhang Z. 2012. A Modified Protocol for RNA Extraction from Different Peach Tissues Suitable for Gene Isolation and Real-Time PCR Analysis. *Molecular Biotechnology* **50**(3): 229-236.
- Tooke F, Ordidge M, Chiurugwi T, Battey N. 2005. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *Journal of Experimental Botany* **56**(420): 2587-2599.
- **Tromp J. 1982.** Flower-bud formation in apple as affected by various gibberellins. *Journal of Horticultural Science* **57**(3): 277-282.
- **Turck F, Fornara F, Coupland G 2008.** Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*, 573-594.
- Ubi BE, Sakamoto D, Ban Y, Shimada T, Ito A, Nakajima I, Takemura Y, Tamura F, Saito T, Moriguchi
 T. 2010. Molecular Cloning of *Dormancy-associated MADS-box* Gene Homologs and Their
 Characterization during Seasonal Endodormancy Transitional Phases of Japanese Pear.
 Journal of the American Society for Horticultural Science 135(2): 174-182.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**: W71-W74.
- van Eeuwijk FA, Bink MCAM, Chenu K, Chapman SC. 2010. Detection and use of QTL for complex traits in multiple environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**(2): 193-205.
- van Ooijen JW 2006. JoinMap [®] 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen, Netherlands: Kyazma B.V.
- **Vavilov NI. 1951.** *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants*. New York: Ronald Press.
- Veit J, Wagner E, Albrechtova JTP. 2004. Isolation of a *FLORICAULA/LEAFY* putative orthologue from *Chenopodium rubrum* and its expression during photoperiodic flower induction. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**(7-8): 573-578.
- Verde I, Abbott AG, Scalabrin S, Jung S, Shu SQ, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori MT, Grimwood J, Cattonaro F, Zuccolo A, Rossini L, Jenkins J, Vendramin E, Meisel LA, Decroocq V, Sosinski B, Prochnik S, Mitros T, Policriti A, Cipriani G, Dondini L, Ficklin S, Goodstein DM, Xuan PF, Del Fabbro C, Aramini V, Copetti D, Gonzalez S, Horner DS, Falchi R, Lucas S, Mica E, Maldonado J, Lazzari B, Bielenberg D, Pirona R, Miculan M, Barakat A, Testolin R, Stella A, Tartarini S, Tonutti P, Arus P, Orellana A, Wells C, Main D, Vizzotto G, Silva H, Salamini F, Schmutz J, Morgante M, Rokhsar DS, Int Peach Genome I. 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics* 45(5): 487-U447.
- Vittrup Christensen J 1996. Rain-induced Cracking of Sweet Cherries: Its Causes and Prevention. In: Webster AD, Looney NE eds. *CHERRIES: Crops Physiology, Production and uses*. Wallingford, UK: CAB INTERNATIONAL.
- **Voorrips RE. 2002.** MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* **93**(1): 77-78.
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M. 2013. Regulation of Flowering by Trehalose-6-Phosphate Signaling in Arabidopsis thaliana. Science 339(6120): 704-707.
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**(6879): 389-395.
- Wang D, Karle R, Iezzoni AF. 2000. QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theoretical and Applied Genetics* **100**(3-4): 535-544.

- Wang J-W, Czech B, Weigel D. 2009. *miR156*-Regulated *SPL* Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**(4): 738-749.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* **10**(1): 57-63.
- Wang ZY, Tobin EM. 1998. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell 93(7): 1207-1217.
- Weigel D, Nilsson O. 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377(6549): 495-500.
- Werner DJ, Okie WR. 1998. A history and description of the *Prunus persica* plant introduction collection. *Hortscience* **33**(5): 787-793.
- Werner JD, Borevitz JO, Uhlenhaut NH, Ecker JR, Chory J, Weigel D. 2005. FRIGIDA-independent variation in flowering time of natural Arabidopsis thaliana accessions. Genetics **170**(3): 1197-1207.
- White RM, Haas JE. 1975. Assessment of research of natural hazards. Cambridge: MIT Press.
- Wilkie JD, Sedgley M, Olesen T. 2008. Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of Experimental Botany* 59(12): 3215-3228.
- Wolfe DW, Schwartz MD, Lakso AN, Otsuki Y, Pool RM, Shaulis NJ. 2005. Climate change and shifts in spring phenology of three horticultural woody perennials in northeastern USA. *International Journal of Biometeorology* **49**(5): 303-309.
- Wu R-M, Walton EF, Richardson AC, Wood M, Hellens RP, Varkonyi-Gasic E. 2012. Conservation and divergence of four kiwifruit *SVP-like MADS-box* genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. *Journal of Experimental Botany* **63**(2): 797-807.
- Xu XM, Rose A, Meier I. 2007a. NUA Activities at the Plant Nuclear Pore. *Plant signaling & behavior* 2(6): 553-555.
- Xu XM, Rose A, Muthuswamy S, Jeong SY, Venkatakrishnan S, Zhao Q, Meier I. 2007b. NUCLEAR PORE ANCHOR, the Arabidopsis homolog of Tpr/MIp1/MIp2/megator, is involved in mRNA export and SUMO horneostasis and affects diverse aspects of plant development. *Plant Cell* **19**(5): 1537-1548.
- Yamaguchi S 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 225-251.
- Yamaguchi S, Kamiya Y. 2000. Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant and Cell Physiology* **41**(3): 251-257.
- Yamane H, Kashiwa Y, Ooka T, Tao R, Yonemori K. 2008. Suppression Subtractive Hybridization and Differential Screening Reveals Endodormancy-associated Expression of an SVP/AGL24-type MADS-box Gene in Lateral Vegetative Buds of Japanese Apricot. Journal of the American Society for Horticultural Science 133(5): 708-716.
- Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Hosaka Y, Sasaki R, Tao R. 2011. Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) *dormancy-associated MADS-box* genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *J Exp Bot* **62**(10): 3481-3488.
- Yoshida N, Yanai Y, Chen L, Kato Y, Hiratsuka J, Miwa T, Sung ZR, Takahashi S. 2001. *EMBRYONIC FLOWER2*, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**(11): 2471-2481.
- Yu H, Xu J, Okuto E, Luedeling E. 2012. Seasonal Response of Grasslands to Climate Change on the Tibetan Plateau. *PLoS ONE* 7(11).
- Zeevaart JAD, Gage DA. 1993. Ent-kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants Spinacia oleracia L and Agrostemma githago L. Plant Physiology 101(1): 25-29.
- Zhang HL, Harry DE, Ma C, Yuceer C, Hsu CY, Vikram V, Shevchenko O, Etherington E, Strauss SH.
 2010. Precocious flowering in trees: the *FLOWERING LOCUS T* gene as a research and breeding tool in *Populus. Journal of Experimental Botany* 61(10): 2549-2560.
- Zhang J-Z, Ai X-Y, Sun L-M, Zhang D-L, Guo W-W, Deng X-X, Hu C-G. 2011. Molecular cloning and functional characterization of genes associated with flowering in *Citrus* using an earlyflowering trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) mutant. *Plant Molecular Biology* 76(1-2): 187-204.

- **Zhang XY, Cong ZT. 2014.** Trends of precipitation intensity and frequency in hydrological regions of China from 1956 to 2005. *Global and Planetary Change* **117**: 40-51.
- Zhebentyayeva TN, Fan S, Chandra A, Bielenberg DG, Reighard GL, Okie WR, Abbott AG. 2014. Dissection of chilling requirement and bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F2 mapping population. *Tree Genetics & Genomes* 10(1): 35-51.
- **Zhou Y, Sun X-D, Ni M. 2007.** Timing of photoperiodic flowering: Light perception and circadian clock. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**(1): 28-34.
- **Zohary D, Hopf M. 2000.** Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of *Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Annexes

Phase	Année	Étape	Stade	Période	
		Sélection des parents	Avant floraison	Fin d'hiver	
PhaseAnnéeÉtapeStadePresidentSélection des parentsAvant floraisonRécolte des fruitsÀ la floraisonRécolte des fruitsÀ maturitéMise en culture d'embryonsDormance embryonnaireCréation variètaleCulture en serrePlantule1Acclimatation (sous ombrière)Plant2Grossissement (en pépinière)Croissance du plant2Plantation en vergerPlant2Plantation en vergerPlant3 à 7Attente des premiers fruits (période juvénile)Niveau hybride10GreffagePorte-greffe/ greffon (hybride x)11Plantation en vergerNiveau 114 à 16Premières récoltes / SélectionNiveau 117GreffagePorte-greffe/ greffon (hybride x)18Plantation en vergerNiveau 221 à 23Premières récoltes / SélectionNiveau 2	Fin Mars, début Avril				
	0	Récolte des fruits	À maturité	Juin et Juillet	
		Mise en culture d'embryons	Dormance embryonnaire	Août à Décembre	
Création variètale		Culture en serre	Plantule	Décembre à Avril	
	1	Acclimatation (sous ombrière)	Plant	Mai à Juin	
	L	Grossissement	Croissance du plant	Juin (année n) à Septembre (année n+1)	
	2	(en pépinière)	croissance du plant		
	2	Plantation en verger	peStadePeriodeDarentsAvant floraisonFin d'hiverÀ la floraisonFin Mars, début AvrilJitsÀ maturitéJuin et JuilleteDormance embryonnaireAoût à DécembrerePlantuleDécembre à Avrila)PlantMai à Juin:Croissance du plantJuin (année n) à Septembre (année n+1)vergerPlantHiververgerPlantToute l'annéeoltes /Niveau hybrideJuin à JuilletvergerNiveau 1Hiveroltes /Niveau 1Juin à SeptembrevergerNiveau 1Juin à SeptembrevergerNiveau 1Juin à Juilletoltes /Niveau 2Hiveroltes /Niveau 2Hiveroltes /Niveau 2Juin à JuilletvergerNiveau 2Juin à Juillet		
	3 à 7	Attente des premiers fruits (période juvénile)	Niveau hybride	Toute l'année	
	7 à 9	Premières récoltes / Sélection	Niveau hybride	Juin à Juillet	
	10	Greffage	Porte-greffe/ greffon (hybride x)	Août à Septembre	
Sélection	11	Plantation en verger	Niveau 1	Hiver	
variétale	14 à 16	Premières récoltes / Sélection	Niveau 1	Juin à Juillet	
	17	Greffage	Porte-greffe/ greffon (hybride x)	Août à Septembre	
	18	Plantation en verger	Niveau 2	Hiver	
Création variètale 1 2 3 à 2 3 à 7 à 10 11 5élection variétale 14 à 17 18 14 14 17 18 14 18 17 18	21 à 23	Premières récoltes / Sélection	Niveau 2	Juin à Juillet	
Sortie variétale	24	Nouvelle variété	Niveau commercial		

Annexe 1. Programme classique d'obtention d'une nouvelle variété de cerisier

Stone fruit







© 1994: BBA und IVA

Stone fruit Meier et al., 1994

Phenological growth stages and BBCH-identification keys of stone fruit

(cherry = *Prunus cerasus* L., plum = *Prunus domestica* L. ssp. *domestica*, peach = *Prunus persica* Batsch., apricot = *Prunus ameriaca* L.)

Principal growth stage 0: Sprouting/Bud development

00	Dormancy: leaf buds and the thicker inflorescence buds closed and covered by dark brown scales
01	Beginning of bud swelling (leaf buds); light brown scales visible, scales with light coloured edges
03	End of leaf bud swelling: scales separated, light green bud sections visible
09	Green leaf tips visible: brown scales fallen, buds enclosed by light green scales

Principal growth stage 1: Leaf development

10	First leaves separating: green scales slightly open,
	leaves emerging
11	First leaves unfolded, axis of developing shoot visible
19	First leaves fully expanded

Principal growth stage 3: Shoot development 1

31 Beginning of shoot growth: axes of develop	ing shoots visible
32 Shoots about 20% of final length	-
33 Shoots about 30% of final length	
3. Stages continuous till	
39 Shoots about 90% of final length	

Principal growth stage 5: Inflorescence emergence

51	Inflorescence buds swelling: buds closed, light brown scales visible
53	Bud burst: scales separated, light green bud sections visible
54	Inflorescence enclosed by light green scales, if such scales are formed (not all cultivars)
55	Single flower buds visible (still closed) borne on short stalks, green scales slightly open
56	Flower pedicel elongating; sepals closed; single flowers separating
57	Sepals open: petal tips visible; single flowers with white or pink petals (still closed)
59	Most flowers with petals forming a hollow ball

Stone fruit Meier et al., 1994

Phenological growth stages and BBCH-identification keys of stone fruit

Code Description

Principal growth stage 6: Flowering

60 First flowers open 61 Beginning of flowering: about 10% of flowers open 62 About 20% of flowers open 63 About 30% of flowers open 64 About 40% of flowers open 65 Full flowering: at least 50% of flowers open, first petals falling 67 Flowers fading: majority of petals fallen 69 End of flowering: all petals fallen

Principal growth stage 7: Development of fruit

71	Ovary growing; fruit fall after flowering
72	Green ovary surrounded by dying sepal crown,
	sepals beginning to fall
73	Second fruit fall
75	Fruit about half final size
76	Fruit about 60% of final size
77	Fruit about 70% of final size
78	Fruit about 80% of final size
79	Fruit about 90% of final size

Principal growth stage 8: Maturity of fruit and seed

81	Beginning	of fruit	colouring
	<u> </u>		<u> </u>

- 85 Colouring advanced
- 87 Fruit ripe for picking
- 89 Fruit ripe for consumption: fruit have typical taste and firmness

Principal growth stage 9: Senescence, beginning of dormancy

- 91 Shoot growth completed; foliage still fully green
- 92 Leaves begin to discolour
- 93 Beginning of leaf fall
- 95 50% of leaves discoloured or fallen
- 97 All leaves fallen
- 99 Harvested product

	AGI	Alias(es)	PRUAV	Sc	Peach Gene ID	START	END	QTL	REFERENCE
1	AT1G01060	LHY	PRUAV000054	Sc 02	ppa001765m	20 159 903	20 167 106	R2-PF-ma-2 G2-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
2	AT1G04400	CRY21	PRUAV001515	Sc 01	ppa002669m	2 748 383	2 753 025	-	Horvath et al, 2009
3	AT1G09530	PIF3	PRUAV009500 PRUAV046297	Sc 06	ppa001899m	25 628 843	25 632 596	-	Horvath et al, 2009
4	AT1G09570	РНҮА	PRUAV016564	Sc 06	ppa000643m	25 571 793	25 575 366	-	Horvath et al, 2009
5	AT1G09700	HYL1	PRUAV015329	Sc 01	ppa004305m	46 214 345	46 217 915	-	Horvath et al, 2009
6	AT1G10570	OTS2C	PRUAV030235	Sc 01	ppa022300m	25 570 819	25 573 216	-	Horvath et al, 2009
7	AT1G12610	DDF1	PRUAV084930	Sc 05	<u>ppa021197m</u>	10 085 521	10 086 243	G5-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
8	AT1G18450	ARP4	PRUAV010449	Sc 04	<u>ppa006685m</u>	8 820 787	8 827 337	R4-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
9	AT1G22770	GI	PRUAV000817 PRUAV005882	Sc 08	ppa000556m	4 036 592	4 046 962	<u>R8-PF-ma-1</u> R8-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
10	<u>AT1G25540</u>	PFT1	PRUAV008084	Sc 01	ppa?	28 995 786	29 004 038	-	Horvath et al, 2009
11	AT1G25560	TMP1	PRUAV018293 PRUAV015181	Sc 01	ppa006243m	28 947 586	28 948 651	-	Horvath et al, 2009
12	AT1G26260	CIB5	PRUAV008924	Sc 01	ppa003619m	28 352 180	28 354 922	-	Horvath et al, 2009
13	AT1G26830	CUL3A	PRUAV001264 PRUAV007214	Sc 03	<u>ppa001982m</u>	19 750 021	19 753 347	-	Horvath et al, 2009
14	AT1G26830	CUL3A	PRUAV001264 PRUAV007214	Sc 01	<u>ppa001991m</u>	26 950 227	26 953 259	-	Horvath et al, 2009
15	AT1G30970	SUF4	PRUAV007354 PRUAV059158	Sc 04	<u>ppa018474m</u>	6 351 022	6 354 743	R4-PF-ma-1 R4-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
16	AT1G48270	GCR1	PRUAV007411	Sc 01	<u>ppa008880m</u>	34 515 562	34 518 750	G1-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
17	AT1G53160	SPL4							Horvath et al, 2009
18	AT1G57820	VIM1	PRUAV042637	Sc 05	<u>ppa015406m</u>	13 130 914	13 135 287	G5-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
19	AT1G60220	OTS1	PRUAV030235	Sc 01	<u>ppa022300m</u>	25 570 819	25 573 216	G1-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
20	AT1G62830	LDL1	PRUAV067054	Sc 01	<u>ppa001504m</u>	32 055 072	32 057 513	G1-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
21	AT1G63030	DDF2							Horvath et al, 2009
22	AT1G65480	FT	PRUAV011973	Sc 06	<u>ppa012320m</u>	28 761 678	28 763 535	-	Horvath et al, 2009
23	AT1G68050	FKF1	PRUAV007655	Sc 01	<u>ppa002863m</u>	30 621 740	30 624 349	G1-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
24	AT1G69120	AP1	PRUAV027765	Sc 01	<u>ppa010723m</u>	27 954 795	27 957 462	-	Horvath et al, 2009
25	AT1G70170	ММР	PRUAV015398 PRUAV026734	Sc 01	<u>ppa007227m</u>	26 031 613	26 032 766	G1-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
26	AT1G71692	AGL12	PRUAV034208	Sc 01	<u>ppa015966m</u>	45 011 005	45 014 883	-	Horvath et al, 2009
27	<u>AT1G76710</u>	SDG26	PRUAV018408	Sc 08	ppa023092m	3 808 908	3 812 368	<u>R8-PF-ma-1</u> R8-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
28	AT1G77080	FLM							2009
29	AT1G77300	SDG8	PRUAV007726	Sc 01	<u>ppa000056m</u>	39 756 898	39 769 256	-	2009
30	AT1G79280	NUA	PRUAV002346	Sc 04	<u>ppa000061m</u>	6 823 622	6 845 405	R4-PF-ma-1	2009
31	AT1G79730	ELF7	PRUAV003173	Sc 03	<u>ppa002145m</u>	3 319 095	3 324 733	R3-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
32	AT1G79730	ELF7	PRUAV003173	Sc 01	<u>ppa002485m</u>	14 367 648	14 373 540	R1-PF-ma-1	2009
33	AT1G80680	SAR3	PRUAV007201	Sc 02	<u>ppa000667m</u>	12 701 774	12 708 276	G2-PF-ma-2	2009
34	AT2G06210	ELF8	PRUAV003418	Sc 07	<u>ppa015419m</u>	19 156 914	19 165 484	-	2009
35	AT2G13540	ABH1	PRUAV006660	Sc 04	<u>ppa001278m</u>	20 137 160	20 154 480	R4-PF-ma-2	2009
36	AT2G18790	РНҮВ	PRUAV022122	Sc 01	<u>ppa000510m</u>	8 772 514	8 777 307	G1-PF-ma-1 G1-PF-ma-1	2009
37	AT2G18915	LKP2	PRUAV006457	Sc 01	<u>ppa004858m</u>	5 683 882	5 685 969	-	2009
38	AT2G19520	FVE	PRUAV000824 PRUAV002091	Sc 07	<u>ppa004586m</u>	19 608 299	19 613 031	-	2009
39	AT2G21070	FIO1	PRUAV020955	Sc 08	<u>ppa003576m</u>	16 266 029	16 269 507	R8-PF-ma-2	2009
40	AT2G21660	GRP7							2009
41	GT022052	SVP/DAM	PRUAV004879	Sc 06	ppa011063m	18 701 564	18 704 722	G6-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
42	AT2G22630	AGL17			1				Horvath et al, 2009
43	AT2G25930	ELF3	PRUAV005120	Sc 01	ppa002858m	35 156 315	35 160 695	G1-PF-ma-2	Horvath et al,
44	AT2G27550	ATC	PRUAV066743	Sc 06	<u>ppa012343m</u>	9 922 335	9 923 704	R6-PF-ma-1 G6-PF-ma-2	Horvath et al, 2009

Annexe 3. Liste des gènes répertoriés au cours de cette étude

	AGI	Alias(es)	PRUAV	Sc	Peach Gene ID	START	END	QTL	REFERENCE
45	AT2G32950	COP1	PRUAV007932	Sc 05	ppa002554m	3 561 261	3 567 747	G5-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
46	AT2G33810	SPL3							Horvath et al,
47	AT2G33835	FES1	PRUAV015266	Sc 04	ppa002526m ?	2436996	2439566	-	Horvath et al,
48	AT2G39250	SNZ							Horvath et al, 2009
49	AT2G40080	ELF4	PRUAV024094	Sc 02	ppa013347m	22 925 861	22 926 807	R2-PF-ma-2	Horvath et al,
50	AT2G42680	MBF1A	PRUAV001900	Sc 03	ppa013074m	9 026 891	9 029 666	R3-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
51	AT2G43410	FPA	PRUAV007438	Sc1	ppa000835m	17 990 633	17 999 997	-	Horvath et al,
52	AT2G45660	SOC1	PRUAV065599	Sc 05	ppb018415m	9 864 052	9 869 277	G5-PF-ma1	Horvath et al,
53	AT2G46340	SPA1	PRUAV014379	Sc 02	<u>ppa014569m</u>	18 987 355	18 993 528	R2-PF-ma2 G2-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
54	AT2G46790	PRR9	PRUAV002351	Sc 02	ppa007290m	20 023 030	20 025 343	G2-PF-ma-2 R2-PF-ma-2	Horvath et al,
55	AT2G46830	CCA1	PRUAV013705	Sc 02	ppa004107m	20 152 864	20 155 832	G2-PF-ma-2	2009 Horvath et al,
56	AT3G01460	MBD9	PRUAV022225	Sc 03	ppa000046m	20 384 557	20 396 802	-	2009 Horvath et al,
57	AT3G03090	VGT1	PRUAV002760	Sc 02	ppa004602m	26 477 931	26 482 325	-	2009 Horvath et al,
58	AT3604610	FIK	PRUAV004409	Sc 06	nna003484m	27 790 958	27 795 857	-	2009 Horvath et al,
59	AT3604680	CLESS	PRI IAV005862	Sc 03	ppa005161m	19 908 287	19 911 174		2009 Horvath et al,
60	AT3609190	E3124.6	PRUAV005167	50.05	pp3000002m	22 717 276	22 718 /21		2009 Horvath et al,
61	AT3610390	FLD	PRUAV005107	Sc 02	ppa005454m	20 598 209	20 601 042	R2-PF-ma2	2009 Horvath et al,
61	AT3C12810	PLD	PRUAV017200	50.02	<u>ppa001272m</u>	7 499 524	7 500 072	G2-PF-ma2	2009 Horvath et al,
62	<u>AT3G12810</u>	PIET	PRUAV020482	Sc 04	<u>ppa00063m</u>	7 488 534	7 500 972	R4-PF-mai	2009 Horvath et al,
63	<u>A13G13682</u>		PRUAV023731	Sc 04	<u>ppa001881m</u>	11 213 900	11 216 438	K4-PF-maz	2009 Horvath et al,
64	<u>A13G15270</u>	SPL5	PRUAV010562	Sc 04	ppa022739m	10 498 301	10 499 141	-	2009 Horvath et al,
65	AT3G19980	FYPP3	PRUAV002173	Sc 01	ppa009178m	31 707 933	31 713 795	G1-PF-ma2	2009 Horvath et al.
66	AT3G20550	DDL	PRUAV004162 PRUAV011214	Sc 04	<u>ppa005178m</u>	12 937 232	12 942 010	R4-PF-ma2	2009 Horvath et al.
67	<u>AT3G20740</u>	FIE	PRUAV013044	Sc 04	<u>ppa007346m</u>	12 566 212	12 570 327	R4-PF-ma2	2009 Horvath et al.
68	<u>AT3G21320</u>	ELF3-LIKE							2009 Horvath et al
69	<u>AT3G24440</u>	VIL1	PRUAV029314	Sc 07	ppa002105	20 505 599	20 509 882	-	2009 Horvath et al
70	AT3G24500	MBF1C	PRUAV029737	Sc 07	<u>ppa013016m</u>	20 590 303	20 590 770	G6-PF-ma2	2009 Horvath et al
71	<u>AT3G33520</u>	ARP6	PRUAV041648	Sc 07	<u>ppa007050m</u>	21 387 741	21 389 652	-	2009 Horvath et al
72	AT3G46640	LUX						PE DE mol	2009
73	AT3G48430	REF6	PRUAV019148	Sc 05	<u>ppa000214m</u>	14 087 553	14 096 069	G5-PF-ma2	2009
74	AT3G54720	AMP1	PRUAV030119	Sc 07	<u>ppa026745m</u>	12 590 169	12 595 463	-	2009
75	<u>AT3G54990</u>	SMZ							2009
76	<u>AT3G58070</u>	GIS	PRUAV016620	Sc7	ppa018057m	12 210 359	12 211 180	-	Horvath et al, 2009
77	AT3G58680	MBF1B							Horvath et al, 2009
78	AT4G00450	CRP	PRUAV011448 PRUAV010722	Sc 02	<u>ppa000036m</u>	18 180 356	18 193 956	R2-PF-ma2 G2-PF-ma-1 G2-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
79	AT4G00650	FRI	PRUAV001515 PRUAV022005 PRUAV012403	Sc 01 Sc 04 Sc 06	ppa004224m ppa003499m ppa003454m				Horvath et al, 2009
80	AT4G01060	CPL3	PRUAV031770	Sc2	ppa023853m	19 069 154	19 070 052	-	Horvath et al, 2009
81	AT4G02020	SWN	PRUAV016583	Sc 08	ppa001254m	21 525 814	21 532 723	-	Horvath et al, 2009
82	AT4G02560	LD	PRUAV005024	Sc 08	ppa000815m	21 079 643	21 086 977	-	Horvath et al, 2009
83	AT4G04885	PCFS4	PRUAV019684	Sc 04	ppa000684m	1 167 428	1 172 996	-	Horvath et al, 2009
84	AT4G06634	C2H2type	PRUAV005303	Sc 01	ppa007287m	42 890 025	42 895 498	-	Horvath et al, 2009
85	AT4G08920	CRY1	PRUAV001243	Sc 01	ppa002375m	41 569 790	41 574 261	-	Horvath et al, 2009
86	AT4G15180	SDG2	PRUAV006459	Sc 03	ppa000055m	16 944 421	16 955 501	R3-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
87	AT4G15880	ESD4	PRUAV016402	Sc 01	<u>ppa017866m</u>	10 217 112	10 220 395	R1-PF-ma-1 G1-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
88	AT4G16280	FCA	PRUAV05057	Sc 01	ppa002369m	8 626 205	8 635 965	R1-PF-ma-1 G1-PF-ma-1	Horvath et al, 2009
89	AT4G20370	TSF							Horvath et al, 2009

	AGI	Alias(es)	PRUAV	Sc	Peach Gene ID	START	END	QTL	REFERENCE
90	AT4G24540	AGL24	PRUAV007453	Sc 01	<u>ppa010758m</u>	46 362 693	46 371 377	-	Horvath et al, 2009
91	AT4G24620	PGI1	PRUAV002237	Sc 01	<u>ppa002932m</u>	46 573 995	46 579 710	-	Horvath et al, 2009
92	AT4G25530	HDG6							Horvath et al,
93	AT4G30200	VEL1	PRUAV000723	Sc 01	ppa001943m	5 841 849	5 849 018	-	Horvath et al,
04	474624520	CIP1	DDUAV004077						2009 Horvath et al,
94	<u>A14034530</u>	CIBI	PRUAV004077						2009 Horvath et al.
95	<u>AT4G35900</u>	FD		Sc 07	<u>ppa018386m</u>	17 775 387	17 776 540	-	2009
96	AT4G39400	BRI1	PRUAV002156	Sc 06	<u>ppa000566m</u>	15 343 679	15 347 372	G6-PF-ma2	2009
97	AT5G01040	LAC8	PRUAV002047	Sc 06	ppa003587m	23 689 627	23 692 309	-	Horvath et al, 2009
98	AT5G02810	PRR7	PRUAV000380	Sc 06	ppb022850m	22 318 527	22 325 338	G6-PF-ma2	Horvath et al, 2009
99	AT5G03840	TFL1	PRUAV035835	Sc 07	ppa012369m	14 280 983	14 282 266	-	Horvath et al,
100	AT5G04240	ELF6	PRUAV047542	Sc 02	ppa000204m	20 801 911	20 808 824	R2-PF-ma2	Horvath et al,
101	475605690	CPD	DRI 141/002502	Sc 02		22 880 857	22 884 712	G2-PF-ma2	2009 Horvath et al,
101	<u>A15005050</u>	CFD aug	PROAV003332	50.02	<u>ppa005000m</u>	22 860 837	22 004 712	112-111-1110-2	2009 Horvath et al,
102	<u>A15G08330</u>	CHE	PRUAV021073	SC 01	<u>ppa010032m</u>	22 653 728	22 655 127	-	2009 Horvath et al
103	<u>AT5G10140</u>	FLC							2009
104	AT5G10625	FPFL1							2009
105	AT5G11530	EMF1	PRUAV031430	Sc 01	<u>ppa000318m</u>	37 002 560	37 008 224	-	Horvath et al, 2009
106	AT5G13480	FY	PRUAV008899	Sc 02	ppa016388m	1 935 608	1 946 116	G2-PF-ma-1 G2-PF-ma-2	Horvath et al, 2009
107	AT5G13790	AGL15		Sc 02	ppa021434m	506 948	510 894	G2-PF-ma-1	Horvath et al,
108	AT5G15840	со	PRUAV007294	Sc 03	ppa007007m	18 343 501	18 345 686	-	Horvath et al,
109	AT5G15850	COL1	PRUAV007294	Sc 03	ppa007007m	18 343 501	18 345 686	-	Horvath et al,
110	ATEC221E0		DRUAV010872	Sc 01	ppa000196m	21 406 240	21 509 756		2009 Horvath et al,
110	<u>A13023130</u>	HUAZ	PROAV010873	30.01	ppa000195m	31 490 240	51 508 750	-	2009 Horvath et al.
111	<u>AT5G24470</u>	PRR5	PRUAV000782	Sc 02	<u>ppa002188m</u>	26 194 161	26 197 660	-	2009 Horvath et al
112	AT5G24860	FPF1	PRUAV063110	Sc 01	<u>ppa013757m</u>	37 633 237	37 633 594	-	2009
113	AT5G37055	SEF	PRUAV020898	Sc 06	<u>ppa012384m</u>	1 735 483	1 736 863	R6-PF-ma1	2009
114	AT5G37770	CML24							Horvath et al, 2009
115	AT5G39550	VIM3							Horvath et al, 2009
116	AT5G46910	REF6-LIKE	PRUAV026742	Sc 05	ppa001299m	3 389 487	3 394 340	G5-PF-ma-1	Horvath et al,
117	AT5G47010	LBA1	PRUAV010094	Sc 05	ppa000334m	5 215 929	5 228 592	G5-PF-ma-1	Horvath et al,
118	AT5G57360	ZTL	PRUAV006457	Sc 01	ppa004858m	5 683 882	5 685 969	-	Horvath et al,
110	475657380	VIN3							2009 Horvath et al,
	<u></u>	Viits						G2-PF-ma-1	2009 Horvath et al,
120	<u>A15G58230</u>	MSI1	PRUAV005812	Sc 02	<u>ppa006205m</u>	14 128 129	14 132 509	G2-PF-ma-2	2009 Horvath et al
121	AT5G60100	PRR3	id PRR7	[1		1	D5 D5	2009
122	AT5G60910	FUL	PRUAVUU2070	Sc 05	ppa010308m	16 634 659	16 637 704	R5-PF-ma1 R5-PF-ma2	Horvath et al, 2009
			PRUAV006561					G5-PF-ma2 R5-PF-ma1	Horvath et al
123	AT5G61150	VIP4	PRUAV001518	Sc 05	<u>ppa004747m</u>	16 366 200	16 370 131	R5-PF-ma2 G5-PF-ma2	2009
124	AT5G61380	TOC1	PRUAV010417	Sc 05	ppa004575m	15 988 613	15 992 638	R5-PF-ma1 R5-PF-ma2	Horvath et al,
			PRI IAV/036733		i i i i i i i i i i i i i i i i i i i			G5-PF-ma2	2009 Horvath et al
125	AT5G61850	LFY	PRUAV025674	Sc 05	<u>ppa006372m</u>	13 116 676	13 119 151	G5-PF-ma2	2009
126	<u>AT5G62040</u>	BFT	pruav041452	Sc 02	<u>ppa021829m</u>	24 921 218	24 922 102	-	2009
127	AT5G62430	CDF1	PRUAV005873	Sc 05	<u>ppa005339m</u>	15 823 666	15 826 061	Correspond à CDF3	Horvath et al, 2009
128	AT5G62640	ELF5	PRUAV000912	Sc 05	ppa004051m	15 312 648	15 316 665	R5-PF-ma1 R5-PF-ma2	Horvath et al,
								G5-PF-ma2	Horvath et al
129	AT5G65050	MAF2							2009 Horvath et al
130	AT5G65060	MAF3							2009
131	AT5G65070	MAF4							Horvath et al, 2009
132	AT5G65080	MAF5							Horvath et al, 2009
133	AT5G65540	SPFT1	PRUAV006898	Sc 06	ppa003035m	19 224 364	19 227 862	G6-PF-ma2	Horvath et al,
134	AT5G67100	ICU2	PRUAV027323	Sc 07	ppa000171m	15 465 493	15 476 074	R7-PF-ma2	Horvath et al,
-		-			L				2009

	AGI	Alias(es)	PRIIAV	Sc	Peach Gene ID	START	END	OTI	REFERENCE
135	AT4G00650	FRIC	PRUAV000207	Sc 01	nna004224m	1 032 031	1 035 612	-	HEI EHEIVEE
137	AT2G32250	FRS2b	PRUAV020984	Sc 03	ppa024183m	14 703 326	14 706 581	R3-PF-ma-2	
138	AT4G15090	FAR1	PRUAV021842	Sc 02	ppa001996m	26 577 271	26 580 535	-	
139	AT3G22170	FHY3b	PRUAV003267	Sc 03	ppa001344m	14 714 849	14 718 257	R3-PF-ma-2	
140	AT5G26660	MVB86b	DRI 141/080807	Sc 04	pp2026618m	6 477 060	6 478 206	R4-PF-ma-1	
140	A15020000	WIT BOOD	FROAV080807	50.04	<u>ppa020010m</u>	0477000	0478200	R4-PF-ma-2	
141	AT2G27110	FRS3b	PRUAV013790	Sc 05	ppa001395m	1 023 275	1 027 242	G5-PF-ma-1	
142	A15G28530	FRS10	PRUAV027505	Sc 03	ppa002284m	15 469 963	15 472 201	R3-PF-ma-2	
145	AT4G11880 AT3G58780	AGL14	PRUAV062012	Sc 03	pp0016415m	13 503 265	13 500 677	B3-PE-ma-2	
145	AT4G16260	Adlit	PROAVOOOOSO	30.03	<u>ppa010378m</u>	15 555 205	15 555 077	R1-PF-ma-1	Rinne et al.
146	POPTR_0010s15270	GH17_44	PRUAV004835	Sc 01	ppa024457m	9 112 831	9 113 838	G1-PF-ma-1	2011
147	AT3G57260	CH17 101		Sc 07	pp2025420m	9 591 355	9 593 563	P7 DE ma 1	Rinne et al.,
147	POPTR_0016s05800	0117_101	FROAVOOOOOO	30.07	<u>ppa023430m</u>	0 301 233	8 382 303	N7-F1-IIId-1	2011
148	AT5G42100	GH17_65	PRUAV000103	Sc 05	ppa006239m	12 746 351	12 747 968	G5-PF-ma-2	Rinne et al.,
	POPTR_0011s15560	_						DC DC ma 1	2011 Diana at al
149	POPTR 0004s21250	GH17_61	PRUAV000448	Sc 06	ppa007079m	10 107 698	10 109 794	G6-PE-ma-1	2011
-	101 III_000 ISEIE00							Gott Ind 2	2011
150	AT4G16260	GH17_39	PRUAV000077	Sc 04	ppa007999m	19 752 124	19 753 853	R4-PF-ma-2	Rinne et al.,
	POPTR_0001s26210								2011
151	AT5G42100	GH17 33	PRUAV005464	Sc 07	ppa007158m	21 336 071	21 338 098	-	Rinne et al.,
-	POPTR_0001s45320								2011
152	POPTR_0001s17660	GA3ox1	PRUAV017521	Sc 01	ppa018007m	37 984 729	37 986 129	-	Rinne et al., 2011
					1				Rinne et al.
153	POPTR_0015s14030	GA20ox8	PRUAV007604	Sc 08					2011
154	AT5G16390.1	ACC	PRI 141/000620	Sc 03	pp2009593m	10 136 301	10 128 /11	P2-DE-ma-2	Hedley et al.,
154	GT022654	ACC	PROAV000020	30.03	<u>ppa005555111</u>	19 130 301	19 138 411	K3-FF-IIId-2	2010
155	AT2G26530.1	CAL	PRUAV016855	Sc 08	ppa006697m	13 885 217	13 886 667	R8-PF-ma-1	Hedley et al.,
	GT027101							R8-PF-ma-2	2010 Hedlow at al
156		CALb	PRUAV006432	Sc 01	ppa008039m	36 501 133	36 502 499	G1-PF-ma-2	2010
								G2-PF-ma-1	Hedlev et al.
157		CALc	PRUAV000501	Sc 02	ppa001109m	1 363 073	1 366 219	G2-PF-ma-2	2010
158		CAL	PRI IAV/002776	Sc 03	ppa012091m	20 277 646	20 278 699	_	Hedley et al.,
158		CALU	FR0A002770	30.03	<u>ppa012051m</u>	20 277 040	20 278 055	-	2010
150				6.05	001675	45.040.070		R5-PF-ma-1 et	Hedley et al.,
159		CALE	PRUAV024877	SC 05	ppa004675m	15 049 078	15 051 467	2 65-PE-ma-2	2010
								R1-PF-ma-2	Hedley et al
160		CALf	PRUAV004837	Sc 01	ppa000516m	22 803 671	22 810 283	G1-PF-ma-1	2010
161	AT5G62690.1	TUP	DBI IAV/000226	50.06	pp2004884m	602 224			Hedley et al.,
101	GT026930	108	PROAVOOU230	30.00	<u>ppa004884111</u>	003 324	000 303	-	2010
162	AT4G36920	AP2	PRUAV065206	Sc 06	ppa003783m	21 564 259	21 567 398	-	Srikanth &
									Schmid, 2011
163	AT1G71800	CSTF64	PRUAV008583	Sc 08	ppa004010m	4 852 558	4 858 364	-	Schmid 2012
	171017700			60.04	0000440	24.045.274	24.054.545		Srikanth &
164	<u>ATIG17760</u>	CSIF//	PRUAV014299	SC 01	<u>ppa002118m</u>	31 845 371	31 864 646	-	Schmid, 2013
165	AT3G19140	DNF							Srikanth &
	<u></u>	5							Schmid, 2014
166	AT4G02780	GA1							Srikanth & Schmid 2015
-		_							Srikanth &
167	AT1G14920	GAI	PRUAV000132	Sc 01	ppa005944m	30 308 500	30 309 838	-	Schmid, 2016
168	AT3G05120	GID1A	PRI 14V/000609	Sc 06	nna018174m	27 102 128	27 103 123		Srikanth &
108	<u>A13003120</u>	GIDIA	PROAVOOOOOO	30.00	ppa010174m	27 102 120	27 103 125	_	Schmid, 2017
169	AT3G63010	GID1B	PRUAV000511	Sc 08	ppa008128m	20 794 610	20 797 327	-	Srikanth &
					+				Srikanth &
170	AT5G27320	GID1C	PRUAV029581	Sc 08	ppa008128m	20 794 610	20 797 327	-	Schmid, 2019
171	ATECEGOCO	CNC			1				Srikanth &
1/1	00000011	GNC			ļ				Schmid, 2020
172	AT4G26150	GNL	PRUAV001270	Sc 07	ppa024374m	19 643 391	19 644 957	-	Srikanth &
					<u>├</u>				Schmid, 2021
173	AT5G17690	LHP1	PRUAV004644	Sc 02	ppa021305m	13 687 709	13 689 728	-	Schmid. 2022
	1720226		DD1143/0025555	c o=		45 407	45 404		Srikanth &
1/4	<u>A12G23380</u>	CLF	PRUAV022733	SC 07	ppa001213m	15 427 185	15 434 449	-	Schmid, 2023
175	AT5651230	EMF2	PRUAV015728	Sc 04	ppa002685m	8 728 803	8 738 738	-	Srikanth &
1,5		21111 2		30.04	<u>pp002005111</u>	2720303	2730730		Schmid, 2024
176	AT2G01570	RGA	PRUAV003980	Sc3	ppa003206m	12 801 491	2 803 272	-	Srikanth &
					<u> </u>	_			Srikanth &
177	AT4G11110	SPA2	PRUAV011427	Sc5	ppa000607m	11 768 672	11 774 614	-	Schmid, 2026
179	AT2G15254	CDV5		Sc/	nna001130m	11 768 672	11 774 614	_	Srikanth &
1/0	M10010004	JF'A5	PROAV003691	314	ppa00112011	11/08/072	11 / / 4 014	-	Schmid, 2027
179	AT2G47070	SPL1	PRUAV000889	Sc1	ppa000690m	8 093 363	8 099 939	-	Srikanth &
			<u> </u>	ł	<u>├</u>				Sciillia, 2028
180	AT3G11540	SPY	PRUAV002897	Sc7	ppa001075m	13 543 313	13 554 878	-	Schmid. 2029
404	AT4000000	TEN 42	DDI IAVOACCOS	6-2		10.053.310	10 050 057		Srikanth &
181	A11008840	I EIVIZ	PRUAVU19923	503	<u>ppa026046m</u>	10 052 310	10 053 257	-	Schmid, 2030
182	AT2G28550	TOF1	PRUAV015049	Sc6	ppa021782m	6 220 679	6 224 096	-	Srikanth &
									Schmid, 2031
183	AT5G60120	TOE2	PRUAV018123	Sc6	ppa021782m	6 220 679	6 224 096	-	Schmid 2022
									Srikanth &
184	AT5G67180	TOE3	PRUAV002171	Sc6	ppa003783m	21 564 259	21 567 398	-	Schmid, 2033
195	AT1678590	TDC1		Sc/	nna001049m	8 016 224	8022 540	_	Srikanth &
103	MI10/0300	11/31	1 10/10/1043	564	ppa00104011	0 910 224	0 922 940	-	Schmid, 2034

	AGI	Alias(es)	PRUAV	Sc	Peach Gene ID	START	END	QTL	REFERENCE
186	AT3G18990	VRN1	PRUAV009961 PRUAV005620	Sc 08	ppa006901m	13 406 334	13 409 235	-	Srikanth & Schmid, 2035
187	AT4G16845	VRN2	PRUAV012853 PRUAV022299	Sc 05	ppa006454m	6 529 485	6 536 288	-	Srikanth & Schmid, 2036
188	AT4G25350.1	SHB1	PRUAV009013	Sc 01	ppa001513m	27 305 797	27 310 045	-	Yun Zhou, Min Ni, 2009
189	AT1G35460.1	FBH1	PRUAV024658	Sc 01	ppa011017m	44 520 026	44 523 162	-	Shogo Itoa et al, 2012
190	AT1G51140.1	FBH3	PRUAV004964	Sc 01	<u>ppa025178m</u>	18 943 457	18 945 753	-	Shogo Itoa et al, 2012
191	AT5G64610.1	HAM1	PRUAV002315	Sc 01	<u>ppa005747m</u>	40 838 319	40 843 052	-	Jun Xiaoa <i>et al,</i> 2012
192	AT5G14750.1	MYB66	PRUAV051588	Sc 01	<u>ppa014884m</u>	25 465 683	25 466 836	-	Eunjoo Seo <i>et</i> <i>al</i> , 2011
193	<u>AT4G25420.1</u>	GA20OX1	PRUAV027728 PRUAV083181 PRUAV082915	Sc 02	<u>ppa006985m</u>	24 678 420	24 680 010	-	Effie Mutasa- Gottgens, Peter Hedden, 2009
194	AT3G26640.1	LWD2	PRUAV007971	Sc 03	ppa007783m	21 898 061	21 899 185	-	Jing-Fen Wu et al, 2008
195	AT2G42280.1	FBH4	PRUAV005454	Sc 06	<u>ppa006295m</u>	3 423 091	3 425 234	-	Shogo Itoa <i>et</i> <i>al</i> , 2012
196	AT3G57130.1	BOP1	PRUAV013721	Sc 07	ppa004578m	8 310 134	8 314 377	-	Mingli Xu <i>et al,</i> 2010
197	AT4G09180.1	FBH2	PRUAV030402	Sc 07	<u>ppa019977m</u>	10 517 554	10 519 657	-	Shogo Itoa <i>et</i> <i>al</i> , 2012
198	EU334633.1	DAM1	PRUAV074730	Sc 08	<u>ppa022274m</u>	7941367	7942765	-	Horvath <i>et al,</i> 2008
199	EU339320.1	DAM2	PRUAV004879	Sc 06	<u>ppa011063m</u>	18701564	18704722	-	Horvath <i>et al,</i> 2008
200	<u>JX966351.1</u>	DAM3	PRUAV004982	Sc 06	<u>ppa011063m ?</u>	18701564	18704722	-	Horvath <i>et al,</i> 2008
201		DAM4	PRUAV002420	Sc 01	<u>ppa011123m</u>	46353152	46360953	-	Leida <i>et al,</i> 2012
202		DAM5	PRUAV009602	Sc 01	ppa010822m	46344191	46351743	-	Leida <i>et al,</i> 2012
203		DAM6	PRUAV007453	Sc 01	ppa010714m	46335147	46342262	-	Leida <i>et al,</i> 2012
204	AT5G44280	RING 1A	PRUAV022204	Sc 04	ppa009446m	2425264	2429942	-	Chen <i>et al,</i> 2010
205	AT1G03770	RING 1B	PRUAV010242	Sc 09	ppa009429m	601147	607633	-	Chen <i>et al,</i> 2010

Préparation de la soutenance





























Etude et compréhension du déterminisme génétique et moléculaire de la floraison chez le cerisier doux (*Prunus avium*)

Chez les espèces fruitières, la floraison est un évènement majeur qui influencera fortement la fructification. Ce processus, finement régulé par de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, est encore peu connu. Chez le cerisier doux (Prunus avium), les fleurs ne s'épanouissent qu'après avoir satisfait des besoins en froid et en chaud. Les effets du changement climatique sur la floraison sont déjà notables et pourraient induire d'importantes pertes économiques. La compréhension des déterminants génétiques et moléculaires impliqués dans la floraison permettra l'amélioration des programmes de sélection variétale visant l'obtention d'arbres adaptés aux futures conditions climatiques. L'objectif de cette thèse est d'accroitre les connaissances sur ces déterminants et d'identifier les gènes contrôlant la floraison chez le cerisier. En étudiant les deux familles intra spécifiques 'Regina' × 'Lapins' et 'Regina' × 'Garnet', la détection de nombreux quantitative trait loci (QTL) sur l'ensemble des groupes de liaisons (GL) a permis de confirmer la forte implication des besoins en froid dans la floraison ainsi que la complexité de ces caractères. Un QTL à effet majeur a été localisé sur le GL4. Dans les régions couvertes par les QTL contrôlant la date de floraison, une centaine de gènes candidats (GC) pour ce caractère a été identifiée. Un sous ensemble de ces GC a ensuite été étudié pour leur expression au cours du développement des bourgeons par PCR quantitative (qPCR). A terme, ces travaux serviront de bases pour l'identification et la sélection de gènes qui permettront l'obtention de génotypes adaptés aux futures conditions climatiques.

Mots clés : gène candidat, approche QTL, besoins en froid, changements climatiques, dormance, expression de gènes, floraison, *Prunus avium*

Study and understanding of the genetic and molecular determinism of flowering in sweet cherry (*Prunus avium*)

In fruit species, the flowering is a major event which strongly influences fructification. This process tiny controlled by many genetic and environmental factors is still little known. In sweet cherry (Prunus avium), flowers open out only after having satisfied chill and heat requirements. The effects of climate change on the flowering are already notable and could induce important economic losses. Identification of genetic and molecular determinants involved in the flowering will allow the improvement of varietal selection programs to obtain trees adapted to future climate conditions. Objective of this thesis is to increase the knowledge of these determinants and identify genes involved in flowering in sweet cherry. By studying two intraspecific progenies 'Regina' × 'Lapins' and 'Regina' × 'Garnet', detection of many quantitative trait loci (QTL) on all linkage groups (LG) has enabled us to confirm the strong involvement of chill requirements in the flowering as well as the complexity of these traits. QTL with major effect was localized on the LG4. In regions covered by all the QTLs controlling flowering date, a hundred candidate genes (CG) for this trait was identified. A subset of these GC was then studied for their expression during development of buds by quantitative PCR (qPCR). In the long term, this work will serve as a basis for the identification and selection of genes that allow obtaining genotypes adapted to future climate conditions.

Keywords : candidate gene, QTL, chill requirements, climate change, dormancy, gene expression, flowering, *Prunus avium*

UMR 1332 – Biologie du fruit et Pathologie (BFP)

Équipe : Adaptation du cerisier aux changements climatiques

71 avenue Édouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon