



Etude physiologique de la dormance des bourgeons chez le cerisier doux (Prunus avium L.)

Rémi Beauvieux

► To cite this version:

Rémi Beauvieux. Etude physiologique de la dormance des bourgeons chez le cerisier doux (Prunus avium L.). Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2017. Français. \langle NNT : 2017BORD0873 \rangle . \langle tel-01809091 \rangle

HAL Id: tel-01809091

<https://theses.hal.science/tel-01809091v1>

Submitted on 6 Jun 2018

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.



HAL Authorization

THÈSE

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 : Biologie végétale

Par

Rémi BEAUVIEUX

**ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA DORMANCE DES
BOURGEONS CHEZ LE CERISIER DOUX (*Prunus avium* L.)**

Présentée et Soutenue le 15 Décembre 2017

Membres du jury :

M. HERNOULD Michel, Professeur, UMR BFP, INRA Bordeaux-Aquitaine	Président
M. REGNARD Jean-Luc, Professeur, UMR AGAP, Montpellier SupAgro	Rapporteur
Mme MAILLARD Pascale, Chargée de Recherche, UMR EEF, INRA Centre Grand Est-Nancy	Rapporteur
M. BONHOMME Marc, Ingénieur de Recherche, UMR PIAF, INRA site de Crouel	Examineur
M. GIBON Yves, Directeur de Recherche, UMR BFP, INRA Bordeaux-Aquitaine	Membre invité

Directrice de thèse :

Mme DIRLEWANGER Elisabeth, Directrice de Recherche, UMR BFP, INRA Bordeaux-Aquitaine

Remerciements

Un tout premier merci pour le soutien financier fourni par la région Aquitaine et l'INRA, au travers du projet AquIPru, ainsi qu'à l'école doctorale SVS (Sciences de la Vie et de la Santé).

Je remercie aussi M. Michel Hernould d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance prochaine de cette thèse.

Je remercie par avance M. Jean-Luc Regnard (qui fût un de mes professeurs il y a quelques années) ainsi que Mme Pascale Maillard d'avoir accepté la charge de rapporteur de ma thèse.

Je remercie aussi M. Marc Bonhomme et M. Yves Gibon d'être examinateur et membre invité, respectivement.

Je souhaite aussi remercier très chaleureusement toute l'équipe A3C pour m'avoir soutenu, depuis le début jusqu'à la fin sans avoir compté, ni leur temps, ni leur énergie. Voici quelques petits mots pour chaque personne, par ordre alphabétique pour ne pas avoir à choisir dans quel ordre les faire apparaître : Anthony (arrivé tardivement, merci d'avoir passé du temps pour m'aider à tenir le coup et je te souhaite le meilleur pour ta thèse, j'essayerai d'être là pour la fin de la tienne, et reste comme tu es, pour le bien des autres autour de toi), Bénédicte (merci pour tous tes précieux conseils, notamment scientifiques et le temps passé à discuter surtout sur la fin, je te souhaite d'avoir bien sûr ton HDR bientôt, ça tombe sous le sens, mais aussi de décipherer (ouais un anglicisme) tous les mécanismes de la dormance et plein de belles publications), Elisabeth (merci premièrement pour m'avoir accueilli pour faire cette thèse, puis pour ta grande énergie au quotidien et tout le soutien dont tu m'as témoigné du début à la fin, ainsi que pour ta transmission de ton amour pour la montagne, je te souhaite de continuer à bien diriger cette équipe et plein d'articles et de courses effrénées dans le couloir en talons), Hélène (merci d'avoir été présente tout au long de cette thèse, et d'avoir partagé de nombreuses pauses cigarettes et tous tes secrets de cuisine entre autres, notamment pour les confits de canards ou magrets séchés, j'attends encore les conseils pour le saumon fumé mais ça attendra d'avoir un fumoir, et merci pour ton enthousiasme à apprendre de nouvelles choses et des moyens de les faire plus efficacement), Jacques (merci pour ta bonne humeur quotidienne ainsi que pour les nombreuses blagues affichées en salle café qui égayaient au moment dudit café, ainsi que pour tout le travail « dans l'ombre », qui comme celui de Lydie, est à la base de tout ce qu'il se fait au labo, je te souhaite de continuer à accomplir ta mission avec brio et de pouvoir arrêter de fumer), José (merci aussi d'avoir été là tout au long de cette thèse, et pas seulement pour ces 2 semaines que je n'oublierai pas au Japon, mais aussi pour ta bonne humeur et tes qualités humaines, ainsi que ton attention aux moindres détails : j'en veux pour preuve lorsque dans un restaurant nous devions payé 5000 yens et que tu as vu que nous n'avions pas mis 5 billets de 1000 mais 5 billets de 10 000, je te souhaite de continuer à l'épanouir dans le cerisier et son amélioration, et d'inscrire une variété au catalogue bientôt, même si cela sera synonyme de vieillesse), Joséan (merci Mr.José pour cette année et demie passée en ta compagnie au labo, ton dynamisme et ton enthousiasme pour la recherche, mais aussi tes rituels étranges comme peler les oranges et conserver le zeste pour faire des infusions, ou encore ton initiation aux randonnées en montagne qui est devenu un vrai plaisir,

je te félicite pour avoir eu ta bourse Marie Curie mais venant de toi je n'en suis qu'à moitié étonné, je te souhaite de conserver ta cadence de rédaction d'articles et de garder la passion et de ne pas trop de geler en Allemagne), Laurent (merci pour ta culture musicale, oenologique et humoristique entre autres, dont nous partageons surtout la deuxième, du moins de mon point de vue ! je te souhaite tout le meilleur possible pour la suite), Loïck (merci pour ta bonne humeur ainsi que pour toutes les anecdotes et conseils super intéressants, non seulement sur le plan scientifique, mais aussi océaniques, culinaires ou encore brassicoles, je te souhaite de découvrir plein de gènes capitaux pour la dormance entre autres, mais aussi de ne pas te faire attaquer par un requin en te déguisant en tortue qui se débat au coucher du soleil dans l'eau trouble avec le pied ensanglanté), Lydie (merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton côté apaisant qui est bénéfique à toute l'équipe, mais aussi tout le travail que tu fais dans « l'ombre » c'est-à-dire dans la serre ou à Toulonne, qui est à la base de tout ce qui se fait dans l'équipe, ou encore pour tous tes conseils sur le végétarisme, je te souhaite de continuer ta mission au sein de l'équipe avec brio comme depuis des années, et de continuer à faire ce succulent jus de pommes bio), Mathieu (merci non seulement pour ta présence et ton aide pendant cette thèse mais aussi pour le stage il y a 8 ans maintenant ! j'espère que tu recevras moins de spam douteux sur ta boîte après mon départ, et que les familles des MYB et DAM n'aura bientôt plus de secrets pour toi), Noémie (merci pour ta bonne humeur quotidienne et tout le travail que nous avons fait ensemble, comme par exemple les prélèvements la nuit l'hiver (l'herbe commençait à geler à 20h, nous sommes venus à 3h du mat) où il fallait travailler sans lumière, ou encore le traitement des arbres en combinaison d'astronaute, je te souhaite plein de courage pour terminer ta thèse dans les meilleures conditions, et non seulement plein d'articles mais aussi et surtout une belle carrière épanouissante), Patrice (arrivé très tardivement aussi, merci d'avoir pu retrouver mon dossier qui avait disparu avec le manuscrit, et ce la semaine avant de le rendre ! et merci pour ta disponibilité et tes bonnes ondes qui permettent de régler les problèmes de réseau sans rien toucher ou presque, je te souhaite tout le meilleur pour cette nouvelle carrière qui débute), Teresa (merci pour tous tes supers conseils, non seulement tout au long de cette thèse et sa rédaction, mais aussi pour tes qualités humaines incontestables et incontestées, je te souhaite plein de beaux articles et peut-être de nouvelles aventures avec le châtaigner, et encore désolé pour ta blessure suite à de trop nombreux prélèvements de petits rameaux de cerisier), Xavier (arrivé tardivement aussi, merci pour tes conseils quant à la gemmotherapie et le Feng shui et la bonne humeur que tu apportes à l'équipe, je te souhaite de réussir cette deuxième carrière qui débute pour toi à le cerise),

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de cette thèse, sans qui ce travail n'aurait été possible : toutes les personnes de la plateforme de BFP, de la plateforme Métatoul, de Roullier, ainsi que les nombreux stagiaires sans qui l'équipe ne pourrait assurer ses missions, notamment pendant les rush hours ! Et à tous les membres de l'UEA qui prennent soin des arbres !

Merci aussi à Ikram qui a partagé ma vie tout au long de cette thèse, bravo à toi tu as réussi à me supporter jusque-là, s'il y avait des oscars dans la catégorie « supportage de mecs super 'relous' en milieu végétal », je pense que tu aurais peut-être remporté la palme d'or ! Et un grand merci à ma famille bien sûr sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Et une petite pensée pour mon petit Pignouf...

Publications

- Campoy JA, Lerigoleur-Balsemin E, Christmann H, **Beauvieux R**, Girollet N, Quero-García J, Dirlewanger E, Barreneche T (2016) Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. *BMC Plant Biology* 16 :49. DOI 10.1186/s12870-016-0712-9
- Beauvieux R**, Wenden B, Ballias P, Christmann H, Gibon Y, Dirlewanger E (2017) Dynamics of bud metabolites during dormancy in sweet cherry genotypes with contrasted chilling requirements. *Acta Horticulturae* (*in press*)
- Beauvieux R**, Wenden B, Dirlewanger E (2018) Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species: A Pivotal Role for Oxidative Cues. *Frontiers in plant science* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00657.
- Beauvieux R**, Wenden B, Vimont N, Ballias P, Christmann H, Gibon Y, Dirlewanger E. Integrated analysis of floral bud dormancy in sweet cherry. *BMC Plant Biology* (en préparation)

Communications

- Beauvieux R**, Wenden B, Gibon Y, Dirlewanger E (2015) Dynamique de métabolites en relation avec l'état de dormance des bourgeons floraux chez le cerisier doux. Colloque francophone sur la phénologie, Aubière, 17-19 novembre 2015 (**Présentation orale**)
- Campoy JA, Lerigoleur-Balsemin E, Christmann H, **Beauvieux R**, Girollet N, Quero-Garcia J, Dirlewanger E, Barreneche, T. (2016) Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. X Jornadas de fruticultura de la SECH. FruitSECH 2016. Las necesidades en frío y calor, clave para la adaptación de los frutales al cambio climático. Murcia, Region of Murcia, Spain. 27/01/2016 – 28/01/2016. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS HORTICOLAS (**Présentation orale**)
- Beauvieux R**, Wenden B, Bénard C, Christmann H, Gibon Y, Dirlewanger E (2016) Metabolites analysis of flower buds during dormancy in sweet cherry. 8th International Rosaceae Genomics Conference (RGC8), Angers, 21-24 june 2016 (**Poster**)
- Campoy JA, Lerigoleur-Balsemin E, Christmann H, **Beauvieux R**, Girollet N, Quero-Garcia J, Dirlewanger E, Barreneche, T (2016) Genetic Diversity and Association Genetics in Sweet. Cherry 8th International Rosaceae Genomics Conference (RGC8), Angers, 21-24 june 2016 (**Présentation orale**)
- Beauvieux R**, Wenden B, Bénard C, Christmann H, Yves Gibon, Dirlewanger E (2017) Physiological analysis of buds dormancy in sweet cherry. International Plant & Animal Genome XXV / January 14-18, 2017 - San Diego, CA, USA (**Poster**)
- Beauvieux R**, Wenden B, Ballias P, Christmann H, Gibon Y, Dirlewanger E (2017) Dynamic of bud metabolites during dormancy in sweet cherry genotypes with contrasted chilling requirement. VIII International Cherry Symposium, Yamagata, Japon, 5-9 juin 2017 (**Présentation orale**)

Résumé

Etude de la dormance des bourgeons chez cerisier doux (*Prunus avium* L.)

Chez les espèces fruitières, la dormance est une période clé qui influencera la floraison et la fructification. La dormance est finement régulée par de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Elle est composée de deux phases principales, l'endodormance (ou dormance « vraie ») et l'écodormance (ou dormance « environnementale »). L'endodormance est caractérisée par une incapacité totale des bourgeons à débourrer, même dans des conditions normalement propices à la croissance. C'est le froid hivernal qui permet la sortie de l'endodormance, nécessaire à la floraison puis la fructification. Les besoins en froid, quantité nécessaire de froid pour accéder à la levée de l'endodormance, sont génétiquement déterminés, et sont relativement élevés chez la plupart des variétés de cerisier doux (*Prunus avium* L.) comparativement à d'autres espèces. Dans un contexte de réchauffement climatique, les besoins en froid pourraient ne plus être satisfaits et conduire à des pertes économiques. L'objectif de cette thèse est donc d'approfondir les connaissances sur les voies impliquées dans la levée d'endodormance. L'étude porte sur un panel de variétés contrastées pour leurs besoins en froid, depuis des variétés très précoces comme 'Cristobalina' jusqu'à des variétés très tardives comme 'Fertard'. Des approches métabolomiques, moléculaires et d'apport exogène de molécules ont été utilisées. Les résultats montrent que les voies 1) hormonale, 2) du stress oxydatif et 3) des sucres, ont un rôle différent. La voie des sucres donne un aperçu de l'activité métabolique ainsi que des marqueurs des différentes phases de la dormance. La voie hormonale est un système permettant de contrôler la croissance sans lien causal sur la dormance. La voie du stress oxydatif indique que les variétés précoces sont dans un état globalement plus oxydé que les variétés tardives lors de cette période. Les données de RNA-seq permettent l'identification de gènes ayant un rôle majeur dans la dormance et de confirmer les hypothèses sur les mécanismes impliqués. Ces résultats seront déterminants pour la création de variétés adaptées aux conditions climatiques futures.

Mots clés : Dormance, métabolisme, expression de gènes, changements climatiques, *Prunus avium* L.

UMR 1332 – Biologie du fruit et Pathologie (BFP)

Equipe : Adaptation du Cerisier au Changement Climatique
71 avenue Édouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon

Abstract

Bud dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.)

Among fruit tree species, dormancy is a key period determining the success of flowering and fruit producing. Dormancy is tightly regulated by numerous genetic and environmental factors. It can be divided in two main phases: endodormancy (“true dormancy”) and ecodormancy (“environmental dormancy”). Endodormancy is characterized by a total incapacity of buds to burst, even in conditions proper to growth. Winter chilling enables the end of endodormancy, necessary for flowering and fruit production. Chilling requirements, necessary amount of chill for endodormancy release, are genetically determined and relatively elevated in sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties compared to other species. In a climate change context, chilling requirements may not be entirely fulfilled and lead to drastic economic losses. The objective of this work is to increase the knowledge on the pathways involved in endodormancy release. The study relies on a panel of varieties contrasted for their chilling requirements, varying from a very low chill cultivar ‘Cristobalina’ to a high chill cultivar ‘Fertard’. Metabolomics and molecular studies, and exogenous molecules supply were used for dormancy deciphering. Hormonal pathway, oxidative stress and sugar pathway seem to have different roles. Sugar pathway enables to have an overview of the metabolic activity, and may be used as markers to identify dormancy phases. Hormonal pathway has a role on growth control but no causal link with dormancy release was assessed. Major results concern the role of oxidative stress, with low chill cultivars in a more oxidized status than high chill cultivars. Moreover, RNAseq data enable the identification of key genes controlling dormancy and confirms the hypothesis on mechanisms involved. These results will be crucial for breeding new varieties well adapted to future climatic conditions.

Keywords: Dormancy, metabolomics, gene expression, climatic change, *Prunus avium* L.

UMR 1332 – Biology of fruit and Pathology (BFP)

Team: Adaptation of Cherry to Climate Change

71 avenue Édouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon

Sommaire

Résumé.....	4
Abstract	5
Sommaire	6
Liste des figures.....	9
Liste des abbréviations.....	11
Liste des tableaux.....	13
Liste des annexes.....	14
Introduction générale.....	16
Chapitre I : Synthèse bibliographique	19
I. Le cerisier	19
I.1. Classification et origine	19
I.1.1. Famille des Rosacées.....	19
I.1.2. Genre Prunus.....	20
I.1.3. Prunus avium L.	22
I.2. Amélioration végétale	22
I.3. Production de cerises	26
I.3.1. Production mondiale	26
I.3.2. Production en France	28
I.4. Biologie du cerisier	29
I.4.1. Le cycle du cerisier et la dormance	32
I.4.2. Les notions de froid et de chaud	35
II. Les changements climatiques et impacts sur le cerisier	36
II.1. Les changements passés	36
II.2. Les changements globaux futurs.....	37
II.3. Les changements climatiques en France métropolitaine.....	39
III. La dormance des arbres et les besoins en froid- (Beauvieux et al. 2018).....	42
Abstract	42
III.1. Introduction.....	42
III.2. Oxidative Stress and Redox Cues	44
III.3. Mitochondrial Respiration.....	46
III.4. Carbohydrates Metabolism.....	48

III.5. Hormonal Signaling	49
III.6. Plasma Membrane and Cell Wall Modifications	52
III.7. Role of Membrane Bound Transporters.....	53
Conclusion	56
Bibliography.....	57
Présentation de la thèse.....	69
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	72
I. Matériel végétal	72
I.1. Dispositif expérimental	72
I.2. Variétés étudiées.....	73
II. Evaluation de la date de levée de dormance et des besoins en froid	74
III. Analyses biochimiques	76
III.1 Analyses spectroscopiques par RMN du proton de molécules organiques	76
III.2. Analyses biochimiques ciblées par dosages enzymatiques.....	77
III.2.1. Préparation du matériel	77
III.2.2. Extraction des métabolites.....	78
III.2.3. Dosage des métabolites	78
IV. Tests de produits pouvant accélérer la levée de dormance	81
V. Analyse de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la dormance des bourgeons.....	82
VI. Bilan des études réalisées au cours de la thèse	83
Chapitre III. Résultats et Discussion	85
I. Evaluation de la date de levée de dormance et des besoins en froid	85
II. Analyses biochimiques	88
II.1. Analyses biochimiques non ciblées : RMN du proton	88
II.2. Analyses biochimiques ciblées : dosages enzymatiques	90
II.2.1. Variation des métabolites au cours du cycle naturel chez plusieurs variétés	90
III. Etude de la voie des hormones	97
III.1 Effet de l'apport exogène de gibbérellines sur la profondeur de dormance	97
III.2 Expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation des gibbérellines au cours de la dormance	101
III.3 Etude du rôle de l'ABA au cours de la dormance.....	102
III.4 Expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'acide abscissique au cours de la dormance.....	105
IV. Stress oxydatif	108
IV.1. Effet d'un traitement par H ₂ O ₂ sur la levée de dormance au cours du temps	108
IV.2 Dosage du glutathion -rapport forme réduite/oxydée (GSH/GSSG).....	109

IV.3 Gènes impliqués dans la détoxification	111
IV.4 Gènes potentiellement impliqués dans la production de ROS	115
Chapitre IV Conclusion et Perspectives	119
Références Bibliographiques	121
Annexes	131

Liste des figures

Figure 1 : Famille des Rosacées divisée en trois sous-familles (Rosidae, Dryadoideae et Spiraeoideae), selon la classification proposée par Potter et al. (2007) (tiré de thèse Castede, 2014)	20
Figure 2 : Cerises vendues sur un étal à Yamagata, Japon.....	27
Figure 3 : Production moyenne en tonnes de cerises douces et acides dans le monde entre 2011 et 2014 (selon FAOstat)	28
Figure 4 : Bouquet de mai	29
Figure 5 : Rameau court avec allongement terminal	30
Figure 6 : Cicatrices d'anciens bouquets de mai.....	30
Figure 7 : Rameaux de cerisier (d'après Wenden).....	30
Figure 8 : Coupe de bourgeon floral de cerisier.....	31
Figure 9 : Position de 28 gènes majeurs cartographiés dans différentes familles sur la carte de référence <i>Prunus</i> (Dirlewanger et al., 2004)	32
Figure 10 : Cycle phénologique du cerisier	33
Figure 11 : Stades phénologiques du cerisier (Alburquerque et al., 2008).....	34
Figure 12 : Evolution, sur les 400.000 dernières années, de la température moyenne de l'Antarctique.	37
Figure 13 : Projection des changements de température moyenne de l'air selon quatre scénarios RCP à différentes échéances temporelles comparativement à la période 1986-2005 au niveau mondial (Collins et al., 2013). L'échelle de couleur représente le gain de degrés Celsius (°C) par rapport à la moyenne mondiale sur la période 1986-2005	38
Figure 14 : Evolution des températures moyennes sur la France en °C en hiver (à gauche) et en été (à droite) de 1950 à 2090 selon les différents RCP (Ouzeau et al., 2014b).	39
Figure 15 : Ecart de température hivernale (°C) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8.5 aux horizons 2021-2050 et 2071-2100(Ouzeau et al., 2014b).	41
Figure 16 : Ecart de température estivale (°C) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8.5 aux horizons 2021-2050 et 2071-2100 (Ouzeau et al., 2014b).....	41
Figure 17 : Réactions biochimiques illustrant le principe du dosage des hexoses.....	79
Figure 18 : Principe du dosage du sorbitol	80
Figure 19 : Principe du dosage de l'acide malique	80
Figure 20 : Test de forçage de rameaux de 7 variétés en 2015-2016	86
Figure 21 : Test de forçage de rameaux de 'Fertard' deux années consécutives	87
Figure 22 : Spectres RMN 1H-Identification partielle des résonances.....	89
Figure 23 : Dosage de métabolites dans les bourgeons floraux de deux variétés de cerisier contrastées pour la date de floraison : 'Cristobalina' (très précoce) et 'Regina' (tardive).....	90
Figure 24 : Profils métaboliques des variétés étudiées en 2015-2016 (en µg/g MF)	93
Figure 25 : Profil des différents métabolites de la variété 'Cristobalina' au cours de cinq phases du cycle	94
Figure 26 : Effet de la pulvérisation d'acides gibbérelliques (GA3 et GA4) et de paclobutrazol sur les bourgeons floraux de cerisier 'Fertard'	97
Figure 27 : Rameaux de 'Fertard' traités, après quatre jours en forçage	98
Figure 28 : Effet de la pulvérisation d'acides gibbérelliques (GA3 et GA4) et de paclobutrazol sur les bourgeons floraux de cerisier de la variété 'Fertard'	99
Figure 29 : Effet sur les bourgeons floraux de cerisier des acides gibbérelliques (GA3 et GA4) et du paclobutrazole en solution dans l'eau où sont placés les rameaux	100
Figure 30 : Profils d'expression de gènes candidats impliqués dans la voie de signalisation des gibbérellines ..	102
Figure 31 : Effet de l'application d'acide abscissique (ABA) et de fluridone sur les bourgeons floraux de la variété 'Fertard'.....	103
Figure 32 : Dosage de l'ABA en fonction du statut de dormance.....	104
Figure 33 : Profil d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ABA.	106

<i>Figure 34 : Effet de l'application du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du pyruvate de sodium sur les bourgeons floraux de cerisier mis en forçage directement (a), après 7 jours (b) ou 35 jours (c) en conditions naturelles. ...</i>	<i>108</i>
<i>Figure 35 : Dosage du glutathion (a) sous forme oxydée (GSSG), (b) sous forme réduite (GSH), (C) la somme GSSG+GSH, (d) ainsi que le ratio GSSG/GSH dans des bourgeons floraux de cerisier depuis juillet jusqu'à la floraison chez 2 variétés contrastées pour leurs besoins en froid : très faibles ('Cristobalina') et forts ('Regina')</i>	<i>110</i>
<i>Figure 36 : Voies de détoxification du H_2O_2 (hydroperoxide) et de l'anion superoxyde (superoxide anion)</i>	<i>112</i>
<i>Figure 37 : Etude du niveau d'expression de gènes liés au métabolisme du glutathion chez deux variétés contrastées pour leurs besoins en froid.</i>	<i>113</i>
<i>Figure 38 : Etude du niveau d'expression de gènes liés à la détoxification du H_2O_2 et de l'anion superoxyde chez deux variétés contrastées pour leurs besoins en froid.</i>	<i>114</i>
<i>Figure 39 : Composants de la membrane mitochondriale impliqués dans la respiration</i>	<i>115</i>
<i>Figure 40 : Heatmap des gènes différentiellement exprimés pour la variété 'Cristobalina'</i>	<i>116</i>
<i>Figure 41 : Expression des gènes impliqués dans la chaîne de respiration en fonction du temps chez 'Cristobalina' et 'Regina'</i>	<i>116</i>

Liste des abbréviations

ABA : Absciscic Acid
ACC : 1-AminCyclopropane-1-Carboxylic acid
ADP : Adenosine Bi-Phosphate
AOX : Alternative OXidase
APX : Alternative PeroXidase
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
BBCH : Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie
BMRB : Biological Magnetic Resonance Bank
CAT : Catalase
CRB : Centre de Ressources Biologiques
DAM : Dormancy Associated MADS box
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EVG : Ever Green
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
FLC : Flowering Locus C
FT : Flowering Time
GA : Gibberellic Acid
GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
GPX : Glutathion PeroXidase
GSH : Glutathion sous forme réduit
GSSG : Glutathion sous forme oxydé
GST : Glutathion-S-Transferase
HC : Hydrogen Cyanamide
HCN : Cyanure d'Hydrogène
HK : HexoKinase
HMDB : Human Metabolome Database
INV : Invertase
IPCC : Intergovernmental Panel on Climate Change
KOD : Deutéroxyde de potassium
KOH : Hydroxyde de potassium
MADS :
MF : Matière Fraîche
MHz : MegaHertz
MPT : Mitochondrial Phosphate Transporter
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
tetrazolium
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NCED : Nine-Cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase
ND : Non Dormant
NIRS : Near Infra Red Spectrum
PGI : PhosphoGluco-Isomerase
PMS : Phenazine MethoSulfate
PPP : Pentose Phosphate Pathway
PVP : PolyVinylPyrrolidone
PVPP : PolyVinylPolyPyrrolidone
QTL : Quantitative Trait Locus

RCP : Representative Concentration Pathway
RGA : Regulator of GA
RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
RNA : Ribo-Nucleic Acid
RNA-seq : Séquençage des ARN totaux
ROS : Reactive Oxygen Species
SNF : Sucrose Non-Fermentable
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOD : SuperOxide Dismutase
SSR : Single Sequence Repeat
TCA : Tri-Carboxylic Acid
TF : Transcription Factor
TPM : Transcrits Par Million
TSP : Triméthylsilyl [2,2,3,3-d4] Sodium Propionate
UEA : Unité Expérimentale Arboricole

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification du genre Prunus selon Rehder, 1974</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 2 : Programme classique d'obtention d'une nouvelle variété de cerisier</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 3 : Principales variétés issues des programmes d'amélioration de différents pays</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 4 : Evolution de la production mondiale de cerise douce</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 5 : Les quatre scénarios RCP (Representative Concentration Pathway) du GIEC</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 6 : Ecart des températures par rapport aux températures de référence sur la période 1976-2005 pour chacun des modèles et scénarios aux horizons 2021-2050 et 2071-2100</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 7 : Caractéristiques des variétés étudiées</i>	<i>74</i>
<i>Tableau 8 : Conditions expérimentales de l'essai ' test produits'</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 9 : Bilan des études réalisées au cours de la thèse</i>	<i>84</i>
<i>Tableau 10 : Etat de dormance des variétés de la core collection à trois dates de prélèvement</i>	<i>85</i>
<i>Tableau 11 : Estimation des besoins en froid (modèle dynamique) des différentes variétés étudiées</i>	<i>86</i>

Liste des annexes

<i>Annexe 1. Bud Dormancy in Perennuiual Fruit Tree Species: A Pivotal Role for Oxidative cues.....</i>	<i>131</i>
<i>Annexe 2. Liste des variétés intégrées dans la core collection</i>	<i>14444</i>
<i>Annexe 3. Échelle internationale BBCH (Meier et al., 1994)</i>	<i>14545</i>
<i>Annexe 4. Mode Opératoire « Dosage des Hormones »</i>	<i>1488</i>
<i>Annexe 5. Liste des gènes répertoriés au cours de cette étude.....</i>	<i>1499</i>
<i>Annexe 6. Dosages de sucres pour les variétés supplémentaires des années 2010-2011 et 2015-2016</i>	<i>14950</i>

Introduction générale

Introduction générale

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. La longévité et la durée de la période juvénile propres à un grand nombre d'espèces pérennes les situent dans une position extrêmement précaire lorsque des changements environnementaux se produisent rapidement.

Face aux 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* L.), 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 espèces telles que le pêcher ou le pommier, reste importante pour l'économie de certaines régions. 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 dormance des bourgeons ont une importance capitale.

En effet, la dormance des bourgeons chez les espèces pérennes est une étape cruciale dans le passage de la période hivernale. 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 et al., 1987). La levée de l'endodormance nécessite une accumulation suffisante de températures basses 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 (Chmielewski and Rötzer, 2001 ; Menzel, 2000).

Les mécanismes impliqués dans la dormance des bourgeons ont été étudiés chez plusieurs plantes pérennes telles que le pêcher, le pommier ou le peuplier (Hsu et al., 2006 ; Rinne et al., 2011). Toutefois, ces mécanismes restent encore mal connus

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

- (1) Quels sont les mécanismes physiologiques impliqués dans la dormance des bourgeons ?
- (2) L'état de dormance des bourgeons peut-il être marqué par leur composition en métabolites ?
- (3) Quels sont les gènes impliqués dans la dormance des bourgeons ?

Pour répondre à ces questions, une étude intégrative associant différentes approches a été choisie, comprenant 1) une évaluation non ciblée (RMN du proton), et ciblée (dosages enzymatiques) des composés métaboliques des bourgeons au cours de la dormance, 2) une étude de l'effet de produits exogènes (hormones et produits entraînant un stress oxydatif) sur la dormance des bourgeons, 3) une étude d'expression des gènes au cours de la dormance par transcriptome.

Ce manuscrit commencera par une synthèse bibliographique, premier chapitre, qui présentera les changements climatiques et leurs impacts, le modèle d'étude le cerisier doux, et décrira le processus de la dormance de manière approfondie. Ensuite, les enjeux et les objectifs de la thèse ainsi que la démarche scientifique suivie, seront présentés. Dans un second chapitre, le matériel et les méthodes utilisés seront décrits. Le troisième chapitre présentera les résultats obtenus qui y seront également discutés. Enfin seront exposées les perspectives à envisager suite à cette étude.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Le cerisier

I.1. Classification et origine

I.1.1. Famille des Rosacées

Le cerisier est un nom générique regroupant plusieurs espèces d'arbres du genre *Prunus* de la famille des *Rosaceae*. Cette famille regroupe plus de 90 genres et 3000 espèces, dont de nombreuses sont d'intérêt économique de premier plan comme par exemple le pommier (*Malus domestica* Borkh.), le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch), le fraisier (*Fragaria sp*) ou encore le rosier (*Rosa sp.*). Pour définir cette famille les botanistes se sont essentiellement basés sur la fleur qui a une symétrie rayonnée en pentamère : les pièces florales (toute partie stérile ou fertile de la fleur) sont toujours organisées par multiple de 5. Des études moléculaires ont permis de confirmer le caractère monophylétique de la famille des rosacées (Evans et al., 2000 ; Morgan et al., 1994). Au sein de cette famille, on trouve différents groupes qui fluctuent en fonction des critères retenus, du temps et des auteurs. Selon Potter et al. (2007), la famille des rosacées est divisée en 3 sous-familles (*Rosoideae*, *Dryadoideae* et *Spiraeoideae*) (Figure 1). 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 1). Le type de fruits est spécifique des genres : akène pour le genre *Fragaria*, piridion pour les *Malus* et *Pyrus* et drupe pour les *Prunus*.

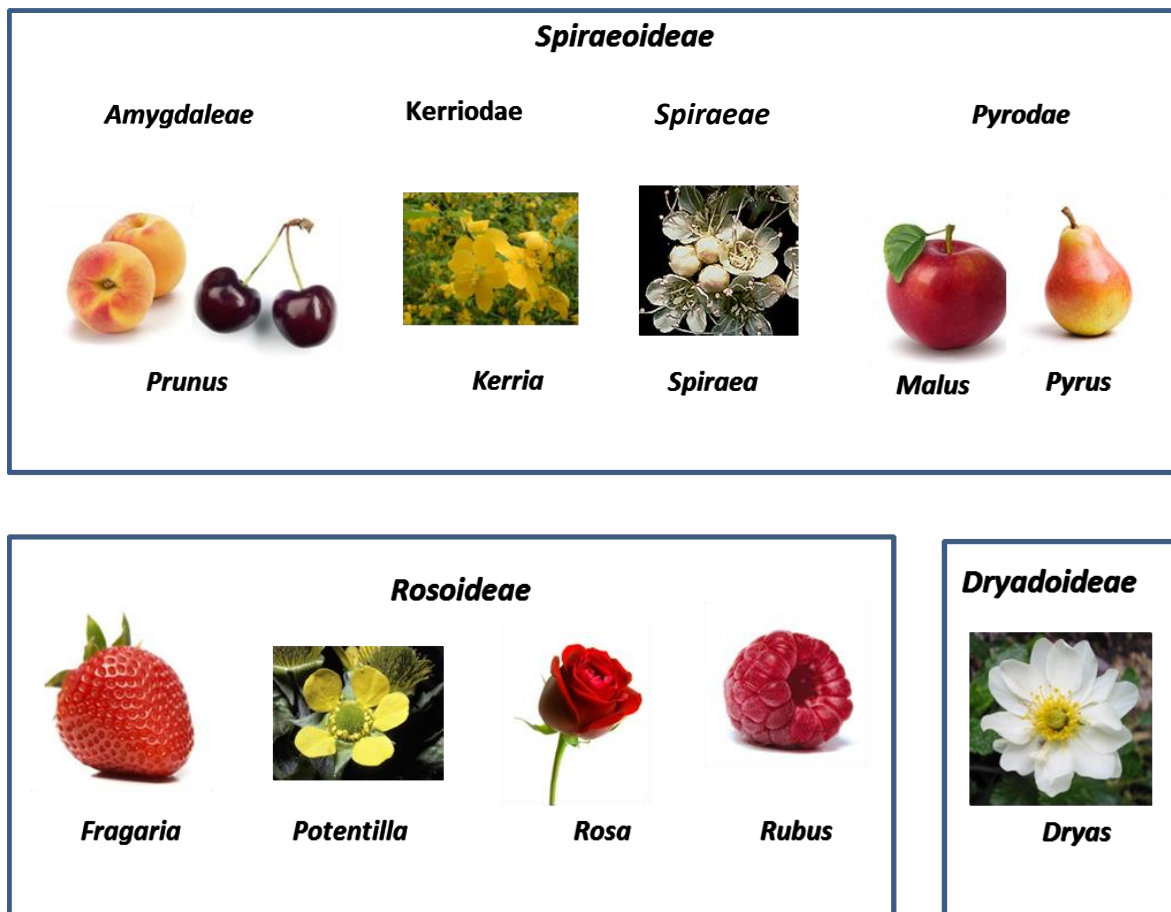


Figure 1 : Famille des Rosacées divisée en trois sous-familles (*Rosidae*, *Dryadoideae* et *Spiraeoideae*), selon la classification proposée par Potter et al. (2007) (tiré de thèse Castede, 2014)

1.1.2. Genre *Prunus*

Le genre *Prunus* regroupe plus de 200 espèces, qui sont des arbres ou des arbustes, dont beaucoup sont des espèces fruitières comme le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch), l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), le prunier domestique (*Prunus domestica* L.) ou encore l'amandier (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A Webb). Ce genre peut être divisé en 5 sous-genres (Rehder, 1949). Le sous-genre *Cerasus* Pers. et le sous-genre *Padus* (Moench) Koehne sont deux sous-genres dans lesquelles des espèces sont appelées cerisier (Iezzoni et al., 2017). *Prunus avium* L. (le cerisier doux) et *Prunus cerasus* L. (cerisier acide) appartiennent au sous-genre *Cerasus* Pers. et plus précisément à la section *Cerasus* Koehne.

Tableau 1 : Classification du genre *Prunus* selon Rehder (1974) (Iezzoni et al., 2017)

Subgenus	Sections	Species	Distribution
CERASUS Pers.	Microcerasus ³ Webb	<i>P. besseyi</i> Bailey <i>P. glandulosa</i> Thumb. <i>P. humilis</i> Bge <i>P. incana</i> (Pall.) <i>P. jacquemontii</i> Hook. <i>P. japonica</i> Thunb. <i>P. microcarpa</i> C.A. Mey <i>P. prostrata</i> Labill. <i>P. pumila</i> L. <i>P. tomentosa</i> Thunb.	Canada, U.S.A. China, Japan N. China S.E. Europe, W. Asia N.W. Himalayas C. China, E. Asia Asia Minor Medit, W. Asia U.S.A. N. & W. China, Japan, and Himalayas
	Pseudocerasus Koehne	<i>P. campanulata</i> Maxim <i>P. cerasoides</i> D. Don <i>P. incisa</i> Thunb. <i>P. kurilensis</i> (Miyabe) Wils. <i>P. nipponica</i> Matsum <i>P. sargentii</i> Rehd. <i>P. serrulata</i> Lindl. <i>P. sieboldii</i> (Carr.) <i>P. subhirtella</i> Miq. ¹ <i>P. yedoensis</i> Matsum	S. Japan, Formosa Himalayas Japan Japan Japan Japan Japan, China, Korea Japan Japan Japan
	Lobopatalum Koehne	<i>P. cantabrigiensis</i> Stapf. <i>P. involucrata</i> Koehne <i>P. pseudocerasus</i> Lindl. <i>P. dielsiana</i>	China C. China N. China China
	Cerasus Koehne	<i>P. avium</i> L. <i>P. cerasus</i> L. <i>P. fruticosa</i> Pall. <i>P. canescens</i> Bois ²	Europe, W. Asia, Caucasus W. Asia, S.E. Europe C. & E. Europe, Siberia C. & W. China
	Mahaleb Focke	<i>P. emarginata</i> (Hook.) Walp. <i>P. mahaleb</i> L. <i>P. pennsylvanica</i> L. <i>P. prunifolia</i> (Greene) Shafer	U.S.A. Europe, W. Asia Canada, U.S.A. Canada, U.S.A.
	Phyllocerasus Koehne	<i>P. pilosiuscula</i> Koehne	C. & W. China
	Phyllomahaleb Koehne	<i>P. maximowiczii</i> Rupr. <i>P. pleiocerasus</i> Koehne	Manchuria, Korea, and Japan
PADUS (Moench) Koehne		<i>P. alabamensis</i> Mohr. <i>P. buergeriana</i> Miq. <i>P. grayana</i> Maxim. <i>P. maackii</i> Rupr. <i>P. padus</i> L. <i>P. serotina</i> Ehrh. <i>P. ssiori</i> F. Schmidt <i>P. virens</i> (Woot. & Standl.) <i>P. virginiana</i> L.	U.S.A. Japan, Korea Japan Manchuria, Korea Europe, N. Asia, Korea, Japan Canada, U.S.A. N.E. Asia, Japan U.S.A. Canada, U.S.A.

¹*P. lannesiana*, listed as a species used in rootstock breeding, is considered to be a subspecies of *P. serrulata*.

²According to its breeding behavior, it is proposed that *P. canescens* belongs to the *Cerasus* section (Schmidt, 1973).

³*Microcerasus* has been recently included in the *Prunus* subgenus using phylogenetic analysis on twelve chloroplast regions and three nuclear genes (Shi et al., 2013).

I.1.3. *Prunus avium* L.

Prunus avium L. regroupe à la fois les merisiers, exploités pour le bois, et les cerisiers cultivés pour leurs fruits sucrés. L'arbre, vigoureux, peut atteindre 30 mètres de haut en forêt et 15 mètres dans les vergers, même si ces valeurs ne sont plus observées dans les vergers actuels. *P. avium* présente une grande variabilité pour de nombreux caractères, comme la taille du mésocarpe (presque inexistant chez le merisier jusqu'à des fruits de 15 grammes pour certaines variétés cultivées), la couleur (du rouge noir au blanc), la fermeté (chair ferme pour les cerisiers de type bigarreaux ou molle de type guignes), l'architecture des branches, la taille et la forme des bourgeons (coniques ou ronds), etc.

La distribution géographique de *P. avium* est très vaste englobant une partie de l'Europe, le Caucase et la Turquie, l'Iran et l'Afghanistan. En France, on en trouve partout, même en montagne jusqu'à 1700 mètres d'altitude. On pense que *P. avium* est originaire des bords de la mer Caspienne et de la mer Noire (Hedrick et al., 1915 ; Iezzoni et al., 2017) ; il s'est ensuite dispersé vers l'ouest de l'Europe. On sait que la consommation de merises existait déjà 5000 ans avant JC (Tavaud, 2000) et que la domestication a commencé vers 4000 avant JC, certains auteurs la situent dans la vallée du Danube (Faust and Surányi, 1996), d'autres dans la partie Ouest de l'Asie (Leroy 1877), d'autres enfin en Grèce (Hedrick et al., 1915). Les premières traces d'amélioration ne sont pas datées. En revanche, la culture de différentes variétés de cerisier semble coutumière dès le XVI^{ème} comme l'attestent des études récentes de noyaux trouvés sur des sites archéologiques (Burger et al., 2011). Le cerisier a ensuite été exporté en Amérique sur la côte est au XIX^{ème} siècle, puis a été disséminé sur une grande partie de l'Amérique du Nord et dans certains pays d'Amérique du Sud (Chili). Aujourd'hui, l'amélioration variétale est entreprise dans de nombreux pays par des organismes privés ainsi que par des organismes publics.

I.2. Amélioration végétale

Bien que le cerisier ait été cultivé depuis plus de 2000 ans, l'amélioration génétique est assez récente, elle aurait débuté dans les années 1800. Un des problèmes qui a limité pendant longtemps la culture du cerisier à une échelle locale de type jardin est sa vie post-récolte très limitée, ainsi que les difficultés dans le transport des fruits. Néanmoins, dès la fin du XIX^{ème} siècle, des programmes modernes d'amélioration ont été lancés aux Etats-Unis et en Russie par des entreprises privées ou des centres de recherche. Cette tendance s'est accélérée à partir des années 1950 avec l'apparition de programmes de sélection dans pratiquement tous les principaux pays producteurs de cerise. Ces programmes concernent à la fois le cerisier doux et le cerisier acide, mais aussi leurs portes greffes, qui peuvent être issus de nombreuses espèces (comme par exemple 'Adara' qui appartient au sous-genre *Prunophora* (*Prunus cerasifera*

Ehrh.)) et même de croisements interspécifiques (ex du porte-greffe Maxma14, issu du croisement entre *Prunus avium* et *Prunus mahaleb*). Parmi les publications sur ce sujet, on peut citer (Quero-Garcia et al, 2017 ; Iezzoni et al., 2017 ; Webster and Looney, 1996).

Les méthodes utilisées pour l'amélioration sont la sélection clonale ou la reproduction sélective, qui consiste à sélectionner la descendance d'individus intéressants pour certains caractères. La descendance choisie peut avoir un géniteur connu (la femelle) ou les deux géniteurs connus. Dans la plupart des cas, les variétés anciennes sont des populations issues d'une ou plusieurs femelles et d'un ou plusieurs mâles ou uniquement d'une femelle et d'un mâle avec tous les cas de figure existants. Ainsi, les variétés présentaient une diversité à minima égale à celle existant entre des pleins frères. Les variétés sélectionnées actuellement correspondent à un individu qui est reproduit de manière végétative. La plupart des variétés modernes sont issues de croisements contrôlés ou de ce que l'on nomme communément de 'semis libres', où on ne connaît en fait que l'identité du parent femelle. Les croisements contrôlés peuvent être réalisés manuellement ou à l'aide de pollinisateurs (abeilles, bourdons) dans des structures confinées. L'obtention d'une nouvelle variété est un processus long et fastidieux (environ 24 ans), composé d'une phase de création puis de sélection variétale, et enfin, d'une phase de sortie variétale (Tableau 2).

Les principaux critères de sélection du cerisier sont :

- la structure de l'arbre et la productivité : ainsi, des variétés peu vigoureuses sont recherchées, pouvant entrer en production relativement vite, tout en étant productives et régulières en production (on veut éviter les phénomènes d'alternance).

- l'autofertilité : ce caractère très peu fréquent devient d'autant plus important dans le cadre du changement climatique puisque les augmentations de température peuvent provoquer des floraisons erratiques et une mauvaise synchronisation entre la variété principale et sa variété pollinisatrice.

- les stress abiotiques : tolérance à l'éclatement du fruit provoqué par la pluie, tolérance au gel hivernal, variétés à faibles besoins en froid ('low chilling') pour éviter les pertes de productivité lors d'hivers doux, tolérance aux fortes températures estivales pour éviter le phénomène de fruits doubles.

- les stress biotiques : les principales maladies du cerisier sont d'origine bactérienne (chancre, provoqué par *Pseudomonas* spp.) ou fongiques (monilia, cylindrosporiose) et les principaux ravageurs sont les mouches (*Rhagoletis cerasi* et plus récemment *Drosophila suzukii*) et le puceron noir (*Myzus cerasi*). Aujourd'hui, très peu de sources de tolérance/résistance ont été mises en évidence pour ces stress.

- la qualité du fruit : elle dépend de tout un ensemble de paramètres dont les plus importants sont le calibre, la fermeté, l'équilibre entre sucres et acides, la couleur de la peau et du fruit, les caractéristiques du pédoncule.

- l'extension de la période de récolte : les producteurs recherchent en effet à élargir la fenêtre de récolte qui est classiquement de 6 à 8 semaines pour un même site.

Tableau 2 Programme classique d'obtention d'une nouvelle variété de cerisier

Phase	Année	Étape	Stade	Période
Création variétale	0	Sélection des parents	Avant floraison	Fin d'hiver
		Hybridation	À la floraison	Fin Mars, début Avril
		Récolte des fruits	À maturité	Juin et Juillet
		Mise en culture d'embryons	Dormance embryonnaire	Août à Décembre
		Culture en serre	Plantule	Décembre à Avril
	1	Acclimatation (sous ombrière)	Plant	Mai à Juin
		Grossissement (en pépinière)	Croissance du plant	Juin (année n) à Septembre (année n+1)
	2	Plantation en verger	Plant	Hiver
Sélection variétale	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
	11	Plantation en verger	Niveau 1	Hiver
	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
	21 à 23	Premières récoltes / Sélection	Niveau 2	Juin à Juillet
Sortie variétale	24	Nouvelle variété	Niveau commercial	

Il existe encore des vieilles variétés dont l'origine est inconnue et qui sont très répandues et/ou largement utilisées dans les programmes d'amélioration ; on peut citer 'Ambrunés', 'Belge', 'Bing', 'Boambe de Cotnari', 'Burlat', 'Büttners Späte Rote Knorpelkirsche', 'Emperor Francis', 'Ferrovia', 'Germersdorfer', 'Gold', 'Hedelfinger', 'Napoleon', 'Noire de Meched', 'Schneiders Späte Knorpel', 'Stark Hardy Giant' et '0900 Ziraat'. Il est intéressant de noter qu'une étude récente de diversité a montré à l'aide de marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) que certaines de ces variétés étaient génétiquement identiques, il s'agit notamment du groupe formé par 'Belge', 'Ferrovia', 'Noire de Meched', 'Badacsonyi' et 'Schneiders Späte Knorpel' (Campoy et al., 2016). D'autres études ont montré à l'aide de marqueurs SSR (Single Sequence Repeat) que 'Germersdorfer' serait aussi identique à ces variétés (Schüller, 2014). Par ailleurs, il est intéressant de souligner l'importante expansion de la variété '0900 Ziraat' qui représente près de 80% de la production totale de cerises en Turquie, premier producteur mondial (Budjdosó and Hrotkó 2017 ; Ercisli, 2014).

Néanmoins, de nombreuses variétés issues de programmes d'amélioration sont largement cultivées aujourd'hui et l'amélioration de la cerise est une activité très dynamique (Quero-Garcia et al., 2017). Ainsi, pendant la période 1991-2004, 230 nouvelles variétés de cerisier ont été commercialisées, plaçant cette espèce en deuxième position au sein du genre *Prunus*, derrière le pêcher. Le Tableau 3 présente les principales variétés de *Prunus avium* L. créées par des programmes d'amélioration de différents pays. Pour certains pays, un seul programme d'amélioration existe, c'est le cas du programme de l'institut Summerland au Canada, sans doute celui ayant eu le plus de succès à l'échelle mondiale. Pour d'autres pays comme par exemple les Etats-Unis, de nombreux programmes publics et privés sont actifs. En France, le programme de création variétale est principalement mené par l'INRA, néanmoins des sélectionneurs privés (G. Delbard, Agro Sélection Fruit (ASF)) contribuent également à la dynamique du secteur.

Tableau 3 : Principales variétés issues des programmes d'amélioration de différents pays

Pays	Variétés
Allemagne	Areko, Namare , Namati, Naprumi, Narana, Oktavia, Regina
Bulgarie	Danelia, Kossara, Rozalina, Rosita, Stefania
Canada	Lapins, Sam, Sandra Rose, Santina, Skeena, Sumele (Satin TM), Sumgita (Canada Giant TM), Summit, Sumnue (Cristalina TM), Sumpaca (Celeste TM), Sumtare (Sweetheart TM), Sumste (Samba TM), Sunburst, Sylvia, Van, SPC103 (Sentennial TM), 13S2101 (Sovereign TM), SPC136 (Suite Note TM)
Chine	Chunxiu, Hongdeng, Jiahong, Longguan, Wanhongzhu, Xiangquan 1
Etats-Unis	Benton, Brooks, Cambrina, Cavalier, Chelan, Coral Champagne, Doty (Early Robin TM), Early Red (Early Garnet TM), Frisco, Lambert, Prime Giant, Rainier, Rocket, Rosie, Royal Bailey, Royal Dawn, Royal Edie, Royal Helen, Royal Rainier, PC 7144.6 (Tieton TM), Tulare, Ulster
France	Arcina (Fercer TM), Bedel (Bellise TM), Ferdiva, Ferdouce, Fermina, Fertard, Fertille, Folfer, Primulat (Ferprime TM), Rivedel (Earlise TM),
Hongrie	Axel, Carmen, Katalin, Linda, Paulus, Rita, Sándor, Vera
Italie	Black Star, Early Star, Giorgia, Grace Star, PA1UNIBO (Sweet Aryana TM), PA2UNIBO (Sweet Lorenz TM), PA3UNIBO (Sweet Gabriel TM)
Japon	Benisayaka, Benishuhou, Satonishiki
Lettonie	Aiya
République Tchèque	Early Korvik, Kordia, Tamara, Techlovan, Vanda
Roumanie	Alex, Andrei, Ludovic, Maria, Rubin, Severin
Royaume-Uni	Merchant, Penny, Summer Sun
Russie	Bryanskaya rozovaya, Iputj
Ukraine	Krupnoplidna, Melitopolska Chorna, Valerij Chkalov

I.3. Production de cerises

I.3.1. Production mondiale

Le cerisier est cultivé dans de nombreux pays au climat tempéré. Le Japon lui voue un véritable culte, à en juger par l'omniprésence de cerisiers, l'attente de la floraison avec impatience chaque année ainsi que le conditionnement de luxe et le tarif exorbitant de leurs fruits (Figure 2). La cerise est le deuxième fruit rouge consommé dans le monde après la fraise, non seulement pour ses caractéristiques organoleptiques, mais aussi pour sa connotation estivale, puisqu'en France par exemple elle est le premier fruit rouge de l'été. Néanmoins, on arrive désormais à trouver, dans nos régions, des cerises en plein hiver, en provenance de régions australes, comme c'est le cas pour de nombreux autres produits. La production mondiale de cerises est en croissance, avec une augmentation des volumes de production de 52% en 16 ans (Lang 2017) (Tableau 4).



Figure 2 : Cerises vendues sur un étal à Yamagata, Japon.

Traditionnellement les régions mondiales les plus productrices sont l'Europe avec 50% du tonnage mondial, puis l'Asie avec environ 30% et enfin l'Amérique du Nord (Figure 3). La production de l'Europe est dominée par trois grands producteurs :

- la Turquie (45% de la production)
- l'Italie (20% de la production)
- l'Espagne (10% de la production)

Tableau 4 : Evolution de la production mondiale de cerise douce en million de Tonne (Lang 2017)

	2001-2003	2015	Evolution 2000-2015
Chili	28	133	x 5
Chine	12	250	x 20
Espagne	101	89	=
Etats-Unis	178	307	x 2
Iran	220	200	=
Italie	113	131	=
Turquie	241	535	x 2

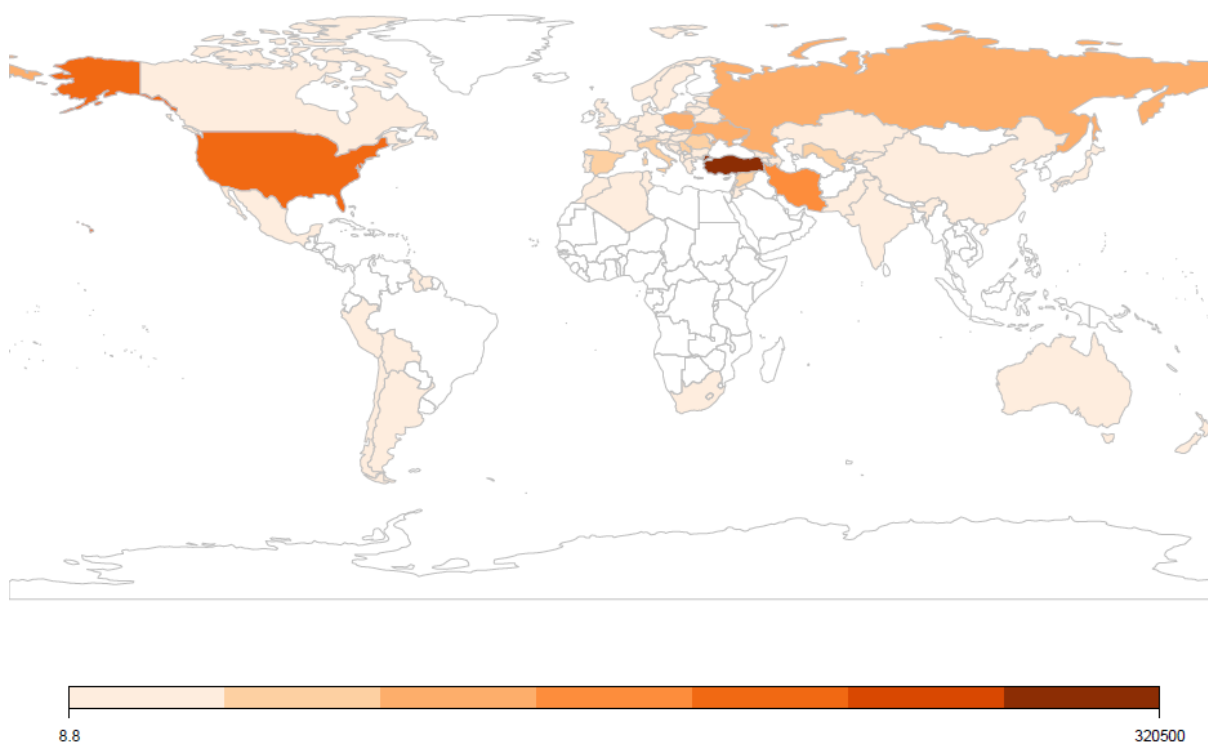


Figure 3 : Production moyenne en tonnes de cerises douces et acides dans le monde entre 2011 et 2014 (selon FAOstat)

Néanmoins, il est important de noter que lors de la dernière décennie, la Chine a engagé de nombreux investissements dans la production de cerises, avec une production annuelle multipliée par 20 entre 2000 et 2015. Elle reste cependant une très faible exportatrice et le deuxième plus grand importateur derrière la Russie.

1.3.2. Production en France

La France pour sa part ne représente plus qu'une petite partie de la production européenne (diminution des surfaces cultivées de 30% entre 2000 et 2016 – France Agrimer cerise 2016), en contraste avec sa situation d'il y a une vingtaine d'années (qui était alors au niveau actuel de l'Espagne). En France, les vergers de cerisier sont de petite taille, 75% des vergers présentent une surface inférieure à 2 hectares mais le nombre de producteurs reste très élevé (plus de 4000 en 2010 ; Agreste Primeur N°277, 2012). La fragilité du produit, notamment vis-à-vis des conditions météorologiques (pluies printanières abondantes) et les coûts très élevés de main d'œuvre comme dans toute activité arboricole ne jouent pas en sa faveur. De plus, depuis l'été 2016, l'interdiction de l'utilisation du diméthoate, substance active la plus utile pour la lutte contre la mouche de la cerise (*Rhagoletis cerasi*) et contre le ravageur plus récent, *Drosophila suzukii*, risque de ne pas améliorer la situation en France. Néanmoins, des

essais de protection mécanique contre ces ravageurs et contre les pluies printanières (bâches) sont à l'essai et pourraient donc améliorer la situation des producteurs.

La production en France se concentre actuellement dans le bassin Sud-Est, même si on retrouve un peu de production dans le quart Sud-Ouest ainsi que la région Nord et Est. Il est intéressant de noter que la baisse de production précédemment citée a surtout affecté la région Aquitaine, avec notamment l'Entre deux Mers et la Gironde. Néanmoins, certains territoires du Sud-Ouest ont conservé une tradition de production de cerise notamment dans le Pays Basque à Itxassou, avec une belle initiative de relance de variétés locales adaptées au climat. Ceci s'est traduit par la création d'un Groupement d'Intérêt Economique (GIE) « Cerise d'Itxassou » et de l'association XAPATA (depuis 1994). L'action de cette association a permis une production multipliée par 3 par rapport aux années 1980.

I.4. Biologie du cerisier

On distingue chez le cerisier comme chez de nombreuses plantes pérennes deux grandes périodes de vie : la phase juvénile au cours de laquelle il n'y a pas de production de fleurs, et la phase adulte avec production de fleurs. La phase juvénile dure entre 3 et 5 ans, au cours de laquelle uniquement des bourgeons végétatifs sont produits. On observe petit à petit au cours des années une augmentation du nombre de bourgeons floraux.

A partir de la phase adulte, on retrouve sur le cerisier doux deux types de structures. La première, les « bouquets de mai » sont très caractéristiques (Figure 4 : Bouquet de mai). Ils sont en fait des rameaux « courts », composés d'un bourgeon végétatif, petit et conique dans la continuité de l'axe, et de bourgeons floraux autour et en dessous (entre 3 et 10) de ce bourgeon végétatif.



Figure 4 : Bouquet de mai

Cette structure croît peu en longueur d'année en année, et on peut voir avec les cicatrices le nombre d'années depuis lequel la structure existe (Figure 5 et Figure 6). Néanmoins, on peut observer parfois cette structure, puis un allongement (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**).



Figure 5 : Rameau court avec allongement terminal

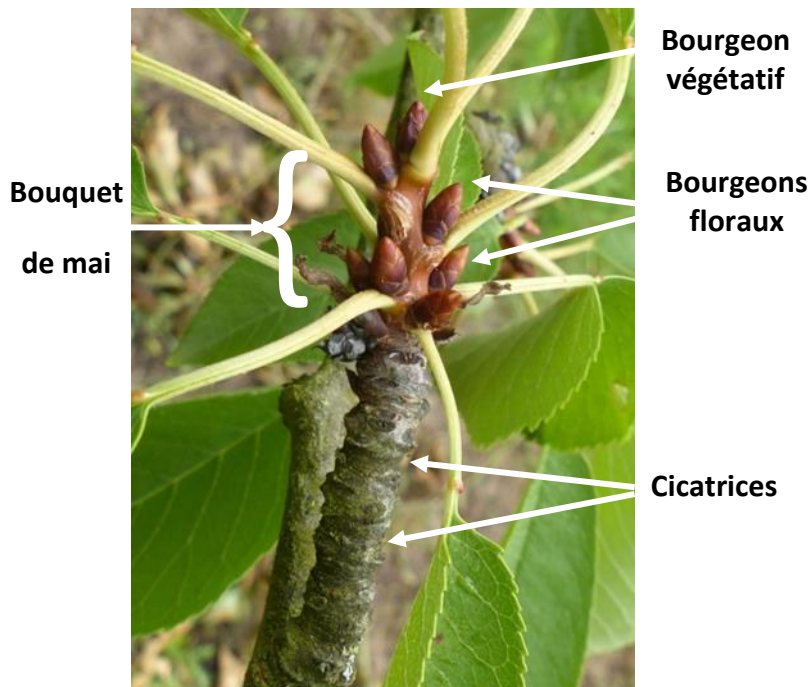


Figure 6 : Cicatrices d'anciens bouquets de mai

Ces rameaux courts sont âgés d'au moins 2 ans. De plus il y a des rameaux « longs » avec un bourgeon végétatif terminal qui permettront une croissance en longueur, et des bourgeons latéraux qui permettront une ramification et le départ d'une nouvelle branche principale (Figure 7).

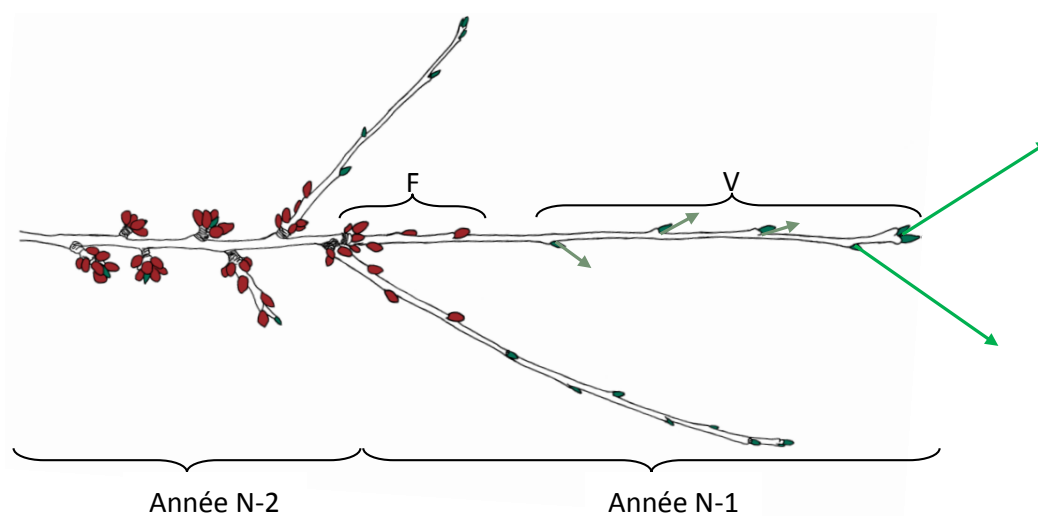


Figure 7 : Rameaux de cerisier (d'après Wenden)

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.

Les bourgeons se forment à l'aisselle des feuilles l'année N puis se développent durant l'été. Tous les bourgeons sont entourés d'écaillés marron dont la composition n'est pas exactement connue, mais probablement riche en polyphénols (Codignola et al., 1988). Ils débousseront au printemps suivant. Un bourgeon végétatif est constitué d'un ensemble d'ébauches foliaires repliées sur elles à la manière d'un oignon. Un bourgeon floral est constitué en moyenne de 3 à 4 ébauches florales qui donneront chacune une fleur (Figure 8).

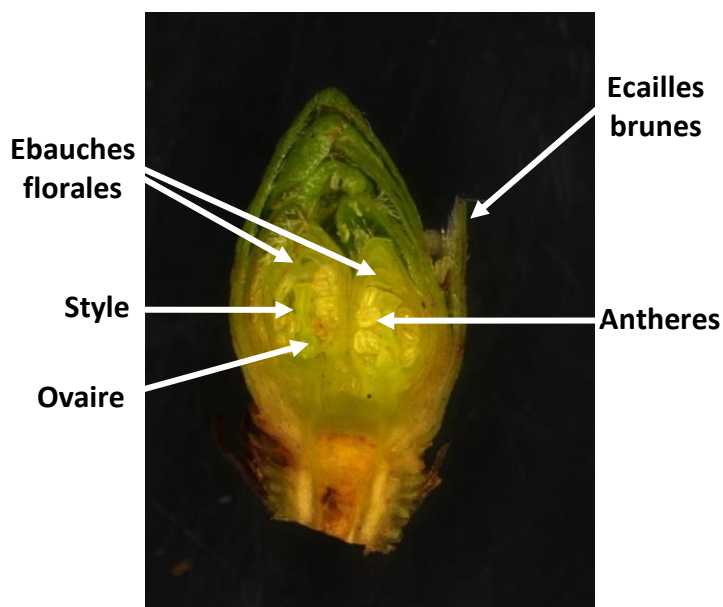


Figure 8 : Coupe sagittale de bourgeon floral de cerisier.

La floraison printanière a une abondance et une répartition temporelle dépendant de la variété mais aussi des conditions climatiques. Le cerisier est une espèce allogame et à pollinisation entomophile, et les caractéristiques des grains de pollen (poids élevé) font que l'anémophilie est quasi inexistante. Les pollinisateurs majoritaires sont les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) ainsi que les bourdons (*Bombus* sp.), et la distance parcourue par ces dernières peut atteindre une centaine de mètres (Lichou et al., 1990). La présence de pollinisateurs est nécessaire car l'espèce est majoritairement incompatible. En effet, comme chez de nombreuses espèces du genre *Prunus*, le cerisier possède un système d'auto-incompatibilité gamétophytique lié au gène S. Celui-ci se positionne sur le groupe de liaison 6 sur la carte génétique de référence des *Prunus* (Dirlewanger et al., 2004) (Figure 9). De nombreux allèles du gène S existent, notés S1 à Sn (De Cuyper et al., 2005 ; De Nettancourt, 2001 ; Schuster, 2012), la fécondation ne peut avoir lieu qu'entre gamètes présentant un allèle S différent. Il y a trois cas de figure pour deux variétés données :

- incompatibilité totale (paire d'allèles identiques)
- incompatibilité partielle (un allèle en commun sur les deux)

- compatibilité totale (aucun allèle identique)

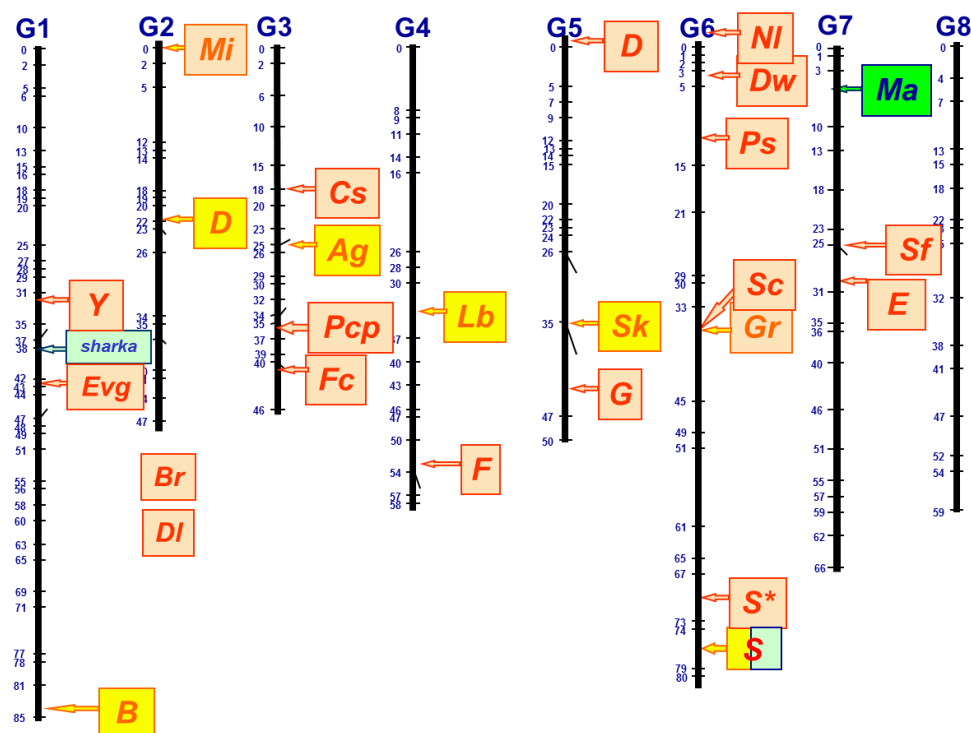


Figure 9 : Position de 28 gènes majeurs cartographiés dans différentes familles sur la carte de référence *Prunus* (Dirlewanger et al., 2004)

Les gènes sont indiqués de différentes couleurs en fonction de l'espèce de *Prunus* : abricotier (vert), pêcher (orange), amandier x pêcher (jaune), prunier (vert). Les abréviations du nom des gènes correspondent à : *Y* : couleur de la chair de la pêche ; *B* : amande/pêche couleur des pétales ; *Sk* : sharka : résistance au Virus Plum Pox ; *B* : couleur de la fleur chez l'amandier x pêcher ; *Mi* : résistance aux nématodes de la pêche ; *D* : dureté de la coque chez l'amandier ; *Br* : port buissonnant ; *DI* : fleur double ; *Cs* : couleur de la chair autour du noyau ; *Ag* : couleur des anthères ; *Pcp* : polycarpel ; *Fc* : couleur de la fleur ; *Ld* : date de floraison ; *F* : adhérence de la chair au noyau ; *D* : caractère fruit doux chez la pêche ; *Sk* : amande amer ; *G* : pêche/nectarine ; *NI* : forme de la feuille ; *Dw* : arbre nain ; *Ps* : stérilité pollinique ; *Sc* : couleur de l'épiderme ; *Gr* : couleur de la feuille ; *S** : fruit plat ; *S* : auto incompatibilité (amandier/abricotier) ; *Ma* : résistance aux nématodes du prunier Myrobalan ; *E* : forme des glandes foliaires ; *Sf* : résistance à l'oidium. (Dirlewanger et al 2004)

Bien évidemment, pour avoir un verger productif, il faut choisir des variétés qui puissent être compatibles et dont la floraison soit synchrone. Il arrive parfois que des ovaires grossissent et donnent alors l'impression qu'il y a eu fécondation mais généralement ceux-ci dépérissent en quelques jours. Après fécondation, la nouaison a lieu, puis le fruit se développe jusqu'à maturité. La durée de développement du fruit est très variable suivant les variétés. Dans un contexte d'amélioration du cerisier l'idéal serait de diminuer au maximum cette période pour minimiser les risques d'incidents biotiques (pathogènes) et abiotiques (climatiques : sécheresse ou fortes pluies). En moyenne, la maturité est atteinte environ deux mois après fécondation.

1.4.1. Le cycle du cerisier et la dormance

Comme beaucoup d'espèces pérennes végétales ou animales, le cerisier a dû adapter son cycle biologique aux contraintes climatiques périodiques. On distingue deux grandes périodes dans

l'année : la période « active » et la période de « repos » (Figure 10 : Cycle phénologique du cerisier). Chez le cerisier doux l'ensemble des étapes aboutissant à la floraison est sous la dépendance de facteurs complexes internes et externes (température et photopériode notamment).

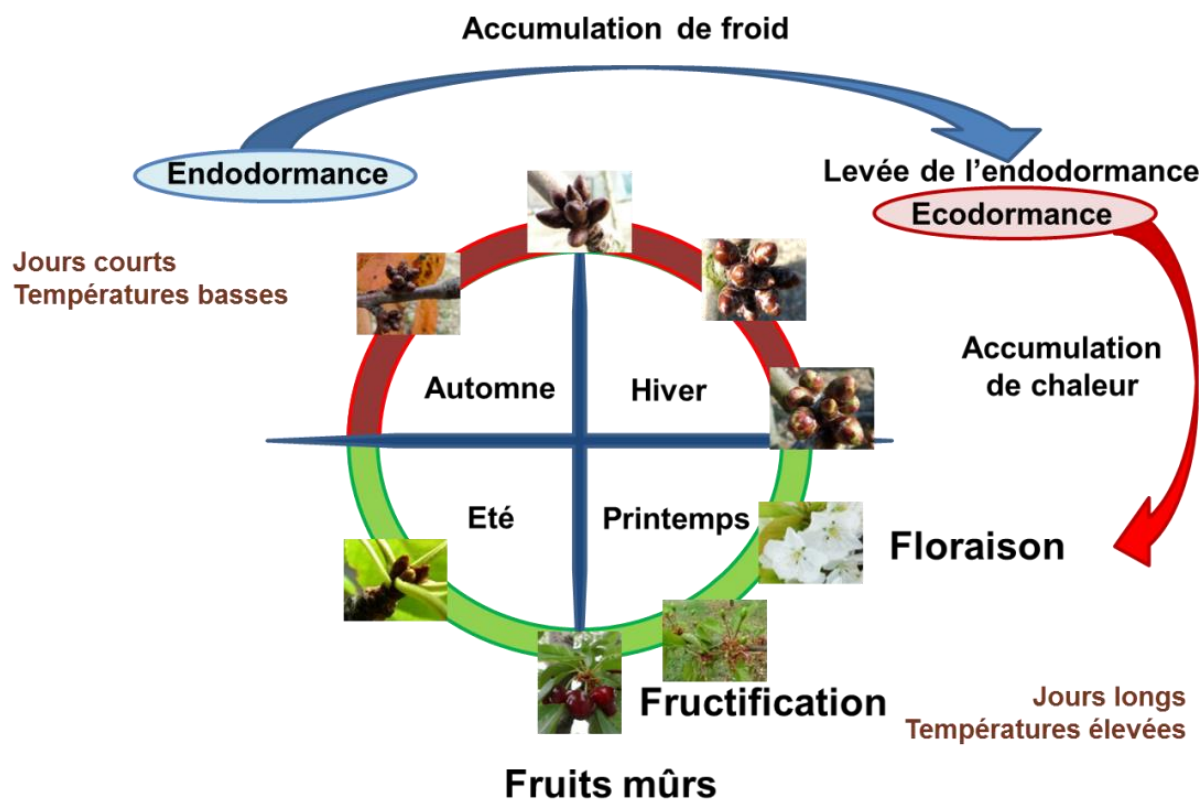


Figure 10 : Cycle phénologique du cerisier

Chaque bourgeon floral suivra un cycle complet allant de l'induction florale à la fructification selon les différents stades phénologiques décrits par Baggiolini (1952) (Figure 11).

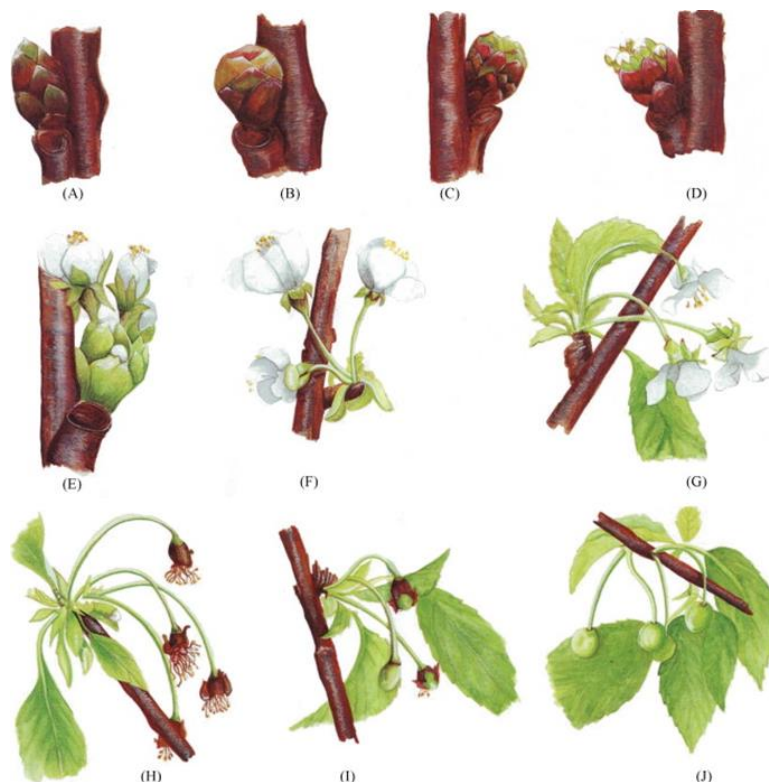


Figure 11 : Stades phénologiques du cerisier (Alburquerque et al., 2008)

(A) En début de dormance, l'arbre est au repos, on observe des bourgeons d'hiver entièrement bruns, aigus et complètement 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 laissent voir les boutons visibles verts encore rassemblés. (D) Les boutons se séparent entre eux, tout en restant enveloppés à leur base 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 apparaître. (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, laissant le petit fruit à nu. (J) Le jeune fruit grossit rapidement et prend bientôt sa forme normale.

Lors de la période active se produit le débourrement des bourgeons floraux et végétatifs, puis la floraison, fructification, croissance végétative et production des ébauches des tissus de l'année suivante. Ces tissus se développent au sein de bourgeons à l'aisselle des feuilles et deviennent visibles à partir de fin juin, et sont déjà recouvert d'écailles marron dès la fin juillet. Puis ces bourgeons vont se développer et croître, les ébauches florales dans les bourgeons floraux vont se différencier. L'emplacement d'un bourgeon dans le bouquet de mai détermine la nature de ce dernier : végétatif ou floral alors que la différenciation n'est pas encore achevée.

Lors de la période dite de « repos » (ou encore endodormance-dormance vraie-dormance physiologique), rien de visible ne se produit, même si un examen minutieux et régulier de bourgeons montre qu'à différents moments, depuis l'automne jusqu'au débourrement, les bourgeons ont la capacité d'être à un stade dit « pointe verte » (de couleur verte ou rouge au sommet du bourgeon), bien qu'aucun débourrement ne soit observé, et que les rameaux placés en forçage n'aient aucune capacité à débousser. C'est la définition même de repos : incapacité physiologique au débournement même en conditions favorables. La sortie de cette période de

repos, qui n'a encore une fois aucun signe visible extérieur, est conditionnée par l'accumulation de froid : une privation totale de froid conduit à la mort des bourgeons. Une fois que les bourgeons sont sortis de cette période de repos, ils rentrent dans une période de quiescence plus que de repos (Considine and Considine, 2016). Celle-ci sera caractérisée par une accumulation de températures chaudes et sera marquée visiblement sur la fin par le gonflement des bourgeons et leur débourrement.

1.4.2. Les notions de froid et de chaud

Ces notions de températures chaudes et froides sont très floues et sont sujettes à de nombreuses études et posent de nombreuses questions. Notamment, y-a-t-il un seuil à partir duquel les températures froides ont un effet sur le bourgeon ? Ce seuil est-il le même en fonction de la période (acclimaté/pas acclimaté) ? A partir de quelle date doit-on considérer qu'il y a « accumulation de froid » ? Des chercheurs ont tenté de répondre à ces questions et de modéliser de manière empirique les quantités de froid reçues, et les premiers travaux font état d'une température dite « froide » de 7,2 °C sur pêcher (Weinberger, 1950). L'idée était de calculer le nombre d'heures en dessous de cette température pendant la dormance et d'additionner ce nombre d'heures, modèle « Chill hours ». Les modèles suivants s'attachaient d'une part à pondérer l'effet des températures selon une courbe en forme de cloche (il y a un optimum de température et les températures alentour permettent d'accumuler mais moins) et d'autre part pour attribuer des valeurs négatives aux températures trop « chaudes » (Erez et Lavee, 1971 ; Overcash et Campbell, 1955). Le modèle Utah propose la sommation des unités de froid, calculées en établissant différentes contributions à différentes gammes de températures, les valeurs élevées (>15,9°C) ajoutent une valeur négative et les températures inférieures à 1,4°C ne sont pas considérées (Richardson et al., 1974). De nombreux modèles dérivés de ce modèle Utah existent et sont espèce-spécifiques (Campoy et al., 2011). Enfin, un troisième type de modèle existe, le modèle dit « dynamique ». Ce modèle dynamique se comporte de la manière suivante : une quantité transitoire de froid est calculée, puis est ajoutée à la quantité déjà calculée si les conditions climatiques sont favorables, sinon cette quantité transitoire est perdue (Fishman et al., 1987). Notons que pour les modèles « Chill hours » et Utah, les unités de froid ne dépendent que de la température et du temps, mais pas du moment auquel cette accumulation se fait, contrairement au modèle dynamique (Luedeling, 2012).

Malgré leur caractère empirique, tous ces modèles, ayant pour objectif de quantifier le froid dont a besoin une variété, sont utiles pour certaines prédictions, notamment pour s'assurer de la possibilité d'une variété ou d'une espèce d'être cultivée à un endroit donné. Néanmoins ils

n'apportent aucune réponse à la question concernant le moment à partir duquel se fait l'« accumulation de froid ». Sur cerisier, la variété très précoce 'Cristobalina' a des feuilles qui jaunissent beaucoup plus tôt qu'une variété tardive appelée 'Regina'. Ainsi, les modèles calculant pour toutes les variétés la quantité de froid à partir d'une date donnée (généralement 1^{er} octobre) se privent d'une information très importante, car le cycle est peut-être simplement décalé dans le temps : les variétés précoces sortent de dormance et fleurissent plus tôt que les tardives car leurs besoins en froid ont été satisfaits plus rapidement.

En outre, les modèles ne prennent pas en compte le caractère « acclimaté » ou « non acclimaté » d'une variété pour le calcul du froid. En effet, le processus d'endurcissement, exposition progressive à des températures de plus en plus extrêmes, permet de résister à des températures beaucoup plus froides que dans le cas normal (Rinne et al., 1998) ; ainsi la perception du froid chez un individu endurci et chez un individu non endurci n'est pas la même (Putti et al., 2003).

Enfin, pour une espèce donnée, toutes les variétés ne montrent pas la même réponse à la température. Une étude portant sur différentes variétés de pommier placées à trois températures différentes montre que certaines variétés répondent plus à une température de 5°C ('Daiane' par exemple) et d'autres à 15°C ('Condessa') (Putti et al., 2003).

Ainsi la quantification d'une quantité de froid nécessaire pour chaque variété n'est pas une chose aisée, les différentes méthodes de calcul présentent des avantages et des inconvénients. Chez la vigne par exemple, le modèle dynamique semble le plus pertinent (Koussa et al., 1994).

II. Les changements climatiques et impacts sur le cerisier

II.1. Les changements passés

Il convient dans un premier temps de différencier conditions météorologiques, qui sont un état de l'atmosphère à un moment et un endroit donnés, et le climat, qui peut être défini comme un ensemble de statistiques de conditions météorologiques sur un pas de temps d'une décade ou plus. Le climat est un équilibre finement régulé au niveau planétaire et très complexe. Il a, à travers le temps évolué, sous l'influence de différents facteurs intrinsèques ou extérieurs à la planète. Ces évolutions climatiques sont définies par une modification durable du climat global de la Terre ou de ses divers climats régionaux. Bien que ces changements climatiques soient réguliers dans l'histoire de la Terre, le récent changement climatique que nous connaissons est particulier, car il résulte de l'activité humaine (probable à 90% en 2007 contre 50% en 1995), et parce que le pas de temps qui le caractérise est bien inférieur aux autres. Sur les 400.000 dernières années, 4 cycles à peu près identiques, environ 100.000 ans chacun,

sont notables (Figure 12). Chaque cycle est caractérisé par une période assez froide de presque 100 000 ans (température moyenne de la planète inférieure de 5° C à maintenant), puis nettement plus chaud (température moyenne de l'ordre de ce que nous connaissons maintenant) pendant 10 à 20.000 ans (Petit et al., 1999).

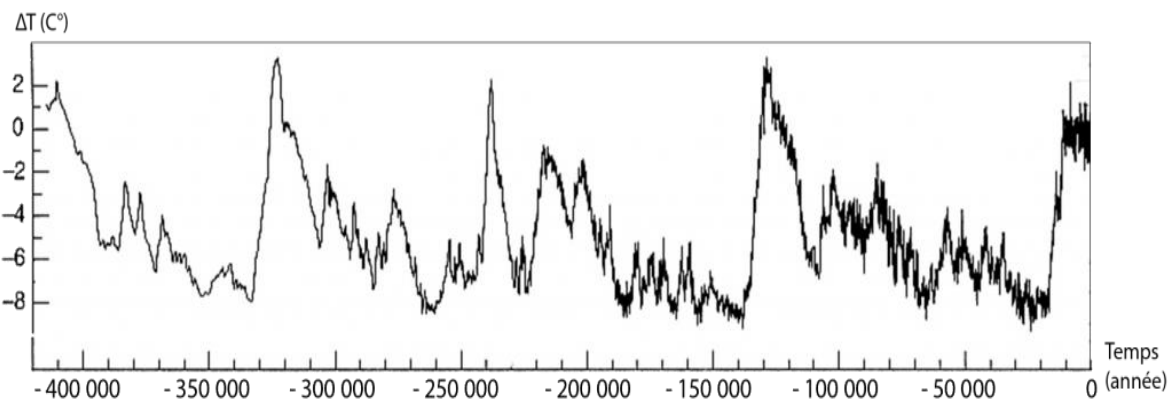


Figure 12 : Evolution, sur les 400.000 dernières années, de la température moyenne de l'Antarctique.
Le 0 de l'axe vertical de gauche correspond à la valeur actuelle. Cette variation de température est légèrement plus élevée que celle de la planète dans son ensemble (Petit et al., 1999).

Plus récemment, sur le dernier millénaire, la température est globalement constante, est c'est à partir de 1850 que l'on constate une tendance claire au réchauffement climatique, avec au XX^{ème} siècle, une augmentation moyenne de 0,6°C de la température du globe, et depuis le milieu des années 1970, une moyenne de 0,17°C par décennie. La première décennie du XXI^{ème} est la plus chaude enregistrée depuis 1850. Ainsi, l'évolution climatique récente imputable à l'homme est bien supérieure à ce qu'a connu la planète par le passé, et cette vitesse semble s'accélérer. Le rapport du Groupe Intergouvernemental d'experts sur l'Evolution du Climat (GIEC), dont le but est d'évaluer régulièrement l'évolution future du changement climatique à différents horizons (jusqu'à 2250), prévoit quatre scénarios possibles.

II.2. Les changements globaux futurs

Ces quatre nouveaux scénarios intègrent les dires d'experts de différents champs scientifiques, notamment économiques, démographiques et technologiques (Tableau 5). Ces prédictions permettent aussi d'explorer l'effet de changements technologiques et politiques notamment pour contrôler les élévations de températures. Bien que sensiblement différents en termes de pessimisme, ces scénarios ont en commun que le réchauffement est la conséquence de l'émission de gaz à effet de serre résultant de l'activité humaine.

Tableau 5 : Les quatre scénarios RCP (Representative Concentration Pathway) du GIEC (Moss et al., 2010)

Nom	Forçage radiatif ¹	Concentration (ppm)	Trajectoire
RCP8.5	>8,5W.m-2 en 2100	>1370 eq-CO2 en 2100	Croissante
RCP6.0	~6W.m-2 au niveau de stabilisation après 2100	~850 eq-CO2 au niveau de stabilisation après 2100	Stabilisation sans dépassement
RCP4.5	~4,5W.m-2 au niveau de stabilisation après 2100	~660 eq-CO2 au niveau de stabilisation après 2100	Stabilisation sans dépassement
RCP2.6	Pic à ~3W.m-2 avant 2100 puis déclin	Pic ~490 eq-CO2 avant 2100 puis déclin	Pic puis déclin

En prenant en compte les quatre scénarios, une augmentation de 0,3°C à 0,7°C de la température moyenne est prévue pour la moitié du XXI^{ème} siècle, avec des variations propres à chaque région (Kirtman et al., 2013). A l'horizon 2100, le scénario moyen RCP4.5 prévoit une augmentation des températures de 2,6°C en moyenne, contre 4,8°C pour le scénario RCP8.5 (Figure 13) (Collins et al., 2013). De plus, les élévations de températures des océans de 0,6°C à 2°C sur les 100 premiers mètres et de 0,3°C à 0,6°C au-delà a été estimée à l'horizon 2100 (Collins et al., 2013) et pourrait avoir un effet d'accentuation du phénomène. En effet, la vapeur d'eau étant un gaz à effet de serre (Kiehl et Trenberth, 1997), son augmentation aurait pour effet d'augmenter le réchauffement et ainsi de suite. De plus, les océans jouent un rôle de puits de carbone, et la quantité de CO2 dissous est inversement proportionnelle à la température de l'eau pour une pression donnée (Wiebe et Gaddy, 1940).

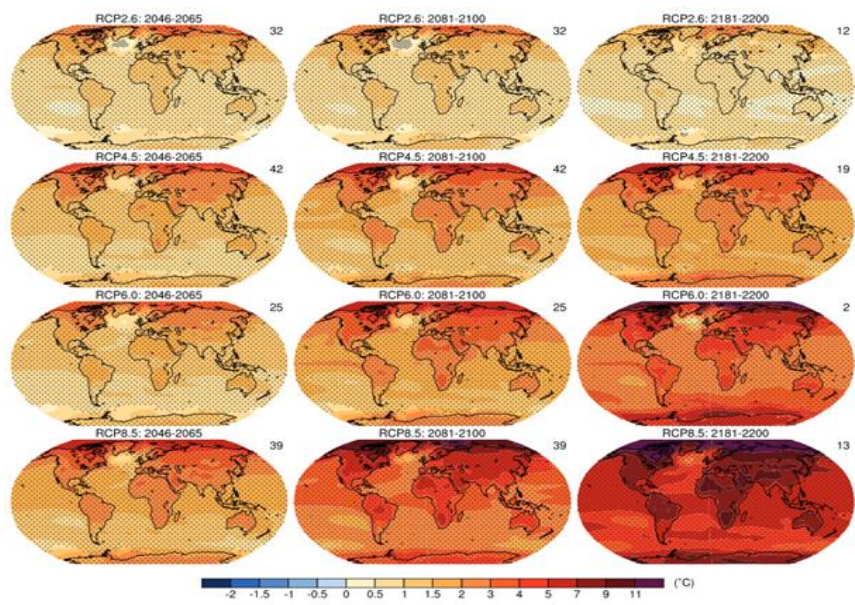


Figure 13 : Projection des changements de température moyenne de l'air selon quatre scénarios RCP à différentes échéances temporelles comparativement à la période 1986-2005 au niveau mondial (Collins et al., 2013). L'échelle de couleur représente le gain de degrés Celsius (°C) par rapport à la moyenne mondiale sur la période 1986-2005

¹ Différence du bilan radiatif au sommet de la stratosphère (en W.m⁻²). Il englobe l'effet net de tous les gaz à effet de serre anthropiques et autres agents de forçage.

II.3. Les changements climatiques en France métropolitaine

Selon Météo France, le réchauffement observé depuis la fin du XIX^{ème} siècle a été en moyenne de l'ordre de 1°C, avec des variations régionales de +0,7°C dans le nord et +1,1°C dans le sud. Dans la dernière étude du GIEC sur le climat futur en France, un horizon à court-terme (de 2021 à 2050) et un horizon à moyen terme (2070 à 2100) sont considérés ainsi que deux grandes saisons (été et hiver), avec pour référence la période 1950-2090 (Ouzeau et al., 2014a) (Figure 14) Aladin-Climat et WRF sont deux modèles régionaux mis en œuvre par les laboratoires français du CNRM et de l'IPSL. C25 et C75 représentent respectivement la valeur du 25^{ème} et du 75^{ème} centile des prédictions de l'ensemble des modèles (valeurs basses et hautes des modèles).

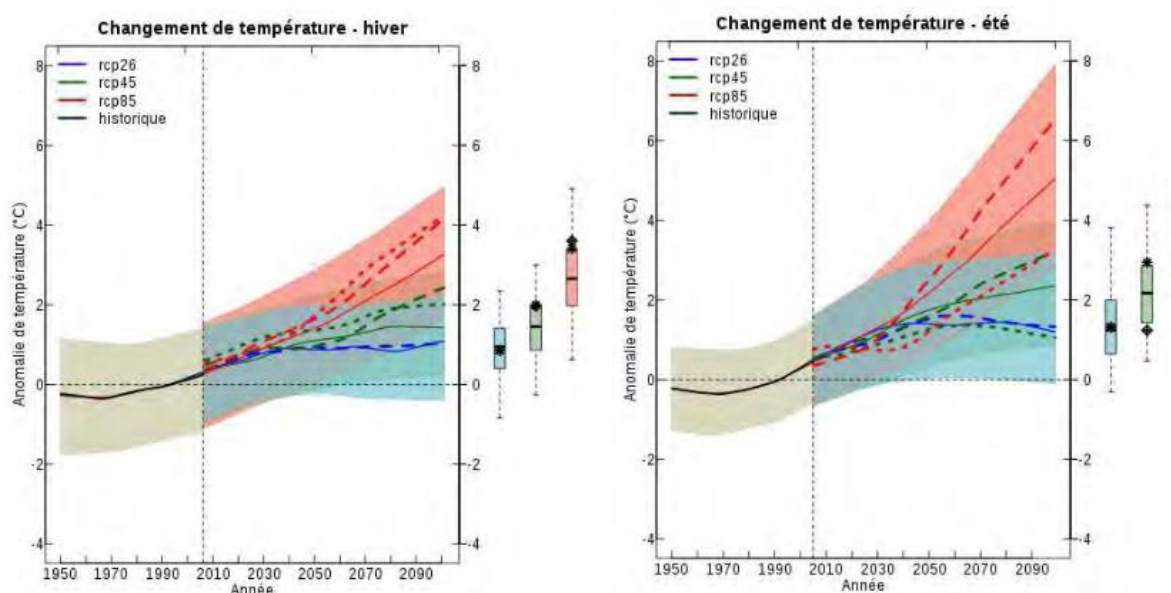


Figure 14 : Evolution des températures moyennes sur la France en °C en hiver (à gauche) et en été (à droite) de 1950 à 2090 selon les différents RCP (Ouzeau et al., 2014b).

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 de moyennes 2071-2100 pour le modèle corrigé Aladin-Climat (astérisques noirs) et le modèle corrigé WRF (losanges noirs).

Tableau 6 : Ecart des températures par rapport aux températures de référence sur la période 1976-2005 pour chacun des modèles et scénarios aux horizons 2021-2050 et 2071-2100 (Ouzeau et al., 2014b)

TEMPERATURE		C25	WRF	Aladin-Climat	C75
HIVER					
2021-2050	RCP2.6	+0,4°C	Indisponible	+0,6°C	+1,3°C
	RCP4.5	+0,3°C	+1,3°C	+0,8°C	+1,4°C
	RCP8.5	+0,5°C	+0,8°C	+1°C	+1,6°C
2071-2100	RCP2.6	+0,4°C	Indisponible	+0,9°C	+1,4°C
	RCP4.5	+0,8°C	+2°C	+2°C	+2°C
	RCP8.5	+1,9°C	+3,6°C	+3,4°C	+3,4°C
ÉTÉ					
2021-2050	RCP2.6	+0,7°C	Indisponible	+1,2°C	+2°C
	RCP4.5	+0,6°C	+1°C	+1,3°C	+1,9°C
	RCP8.5	+0,9°C	+0,6°C	+1,2°C	+2°C
2071-2100	RCP2.6	+0,6°C	Indisponible	+1,3°C	+2°C
	RCP4.5	+1,4°C	+1,2°C	+2,9°C	+2,9°C
	RCP8.5	+3,2°C	+2,6°C	+5,3°C	+5,1°C

D'ici la moitié du XXI^{ème} siècle, quel que soit le scénario et le modèle considéré, une hausse des températures moyennes annuelles de 0,6°C à 1,3°C sur le territoire est prévisible. Pour préciser ces évolutions, la distinction des saisons est importante. Ainsi, en hiver, le modèle et le scénario impactent peu le changement de température attendu, qui atteint +1°C à +2°C à l'horizon 2050 (Tableau 6). C'est à l'horizon 2071-2100 que les différences entre les scénarios deviennent les plus importantes pour cette saison, avec une température atteignant environ 0,9 à 3,6 °C de plus que la moyenne de référence pour les modèles selon les scénarios (Tableau 6). Ce phénomène de réchauffement hivernal serait plus prononcé dans le Sud-Est et la partie extrême Sud-Ouest (Figure 15). Le phénomène estival est similaire, mais le réchauffement n'impacterait pas le Sud-Est en priorité mais une grande partie du territoire, surtout à l'horizon 2071-2100 (Figure 16).

Outre les températures, un autre aspect important du changement climatique est de pouvoir quantifier la survenue de périodes extrêmes, comme le nombre de jours de vague de chaleur, les extrêmes froids, les périodes de sécheresses, les périodes de pluies violentes etc.

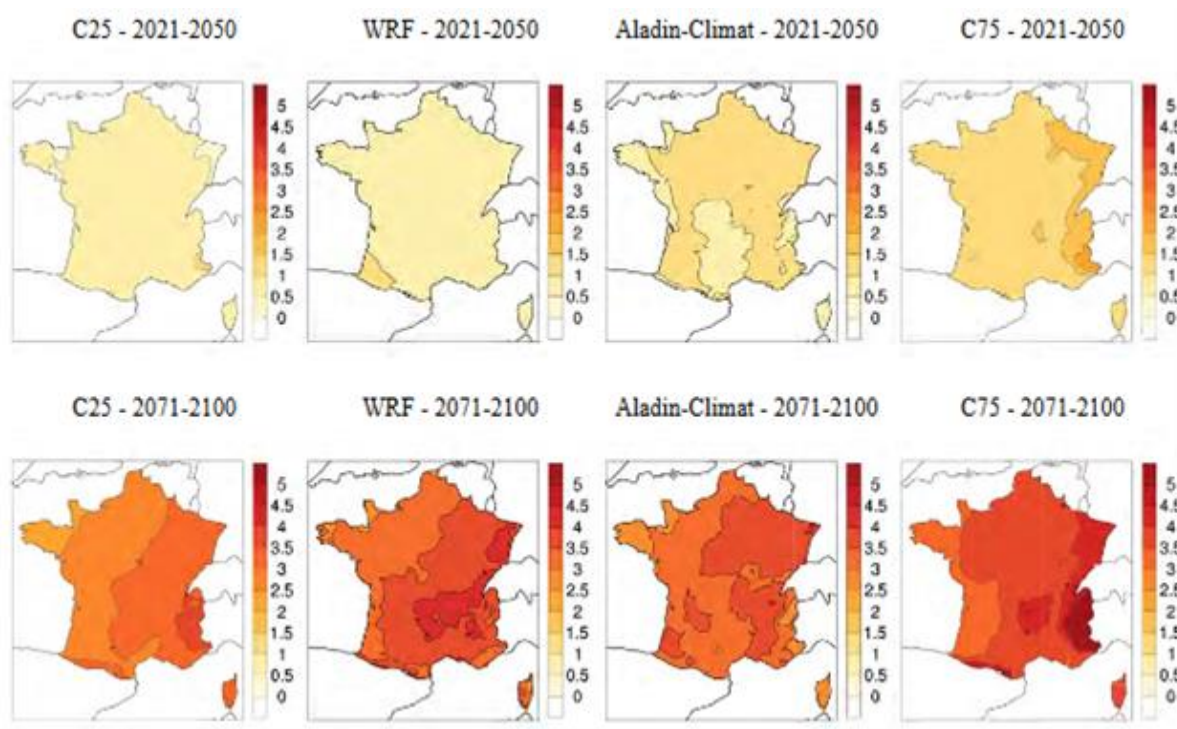


Figure 15 : Ecart de température hivernale (°C) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8.5 aux horizons 2021-2050 et 2071-2100(Ouzeau et al., 2014b).
 Pour chaque ligne, de gauche à droite : 25^{ème} centile de l'ensemble, WRF, Aladin-Climat, 75^{ème} centile de l'ensemble.

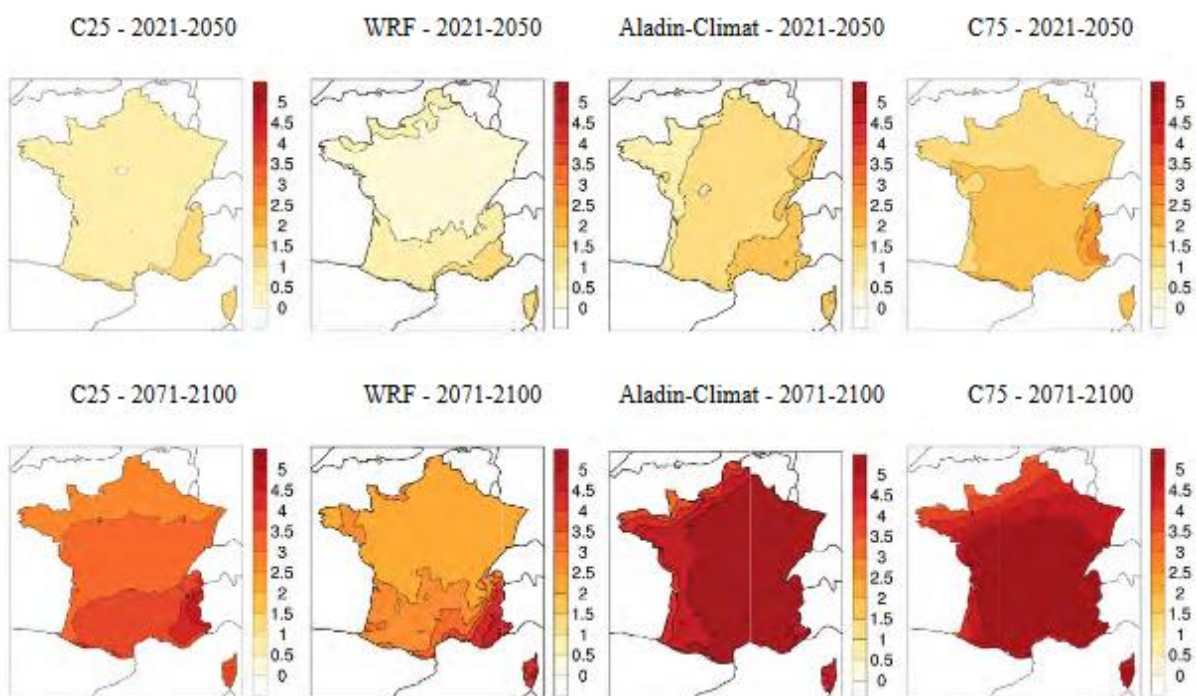


Figure 16 : Ecart de température estivale (°C) en France relativement à la référence 1976-2005, pour le scénario RCP8.5 aux horizons 2021-2050 et 2071-2100 (Ouzeau et al., 2014b).
 Pour chaque ligne, de gauche à droite : 25^{ème} centile de l'ensemble, WRF, Aladin-Climat, 75^{ème} centile de l'ensemble.

III. La dormance des arbres et les besoins en froid

Frontiers in Plant Science

Bud dormancy in perennial fruit tree species: a pivotal role for oxidative cues

Rémi Beauvieux, Bénédicte Wenden, Elisabeth Dirlewanger*

UMR 1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, Villenave d'Ornon, 33140, France

Correspondence:

Dr Elisabeth Dirlewanger

Elisabeth.dirlewanger@inra.fr

Abstract

For perennial plants, bud dormancy is a crucial step as its progression over winter determines the quality of bud break, flowering and fruiting. In the past decades, many studies, based on metabolic, physiological, subcellular, genetic and genomic analyses, have unraveled mechanisms underlying bud dormancy progression. Overall, all the pathways identified are interconnected in a very complex manner. Here, we review early and recent findings on the dormancy processes in buds of temperate fruit trees species including hormonal signaling, the role of plasma membrane, carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration and oxidative stress, with an effort to link them together and emphasize the central role of ROS accumulation in the control dormancy progression.

Keywords: bud dormancy, perennial fruit species, hormonal pathways, carbohydrate metabolism, oxidative stress

III.1. Introduction

In the context of perennial plants, bud dormancy is a crucial step in the phenology cycle, as its progression over winter determines the quality of bud break, flowering and fruiting. The term “dormancy” is associated with temporary suspension of visible growth. It comprises true dormancy (“rest” or “endodormancy”) triggered by internal factors, and climatic dormancy (“quiescence” or “ecodormancy”) controlled by external factors (Lang et al., 1987; Considine

and Considine, 2016). These phases of dormancy are alleviated by different elements: release of endodormancy requires cold accumulation whereas ecodormancy advances with heat accumulation toward bud break. For perennial fruit species, in the context of global warming, endodormancy release may be a critical step in the future due to insufficient chill accumulation, directly affecting flowering quality and uniformity, and thus leading to a drastic reduction of fruit production. In the past decades, much work has been done to unravel the mechanisms underlying dormancy period, and the diversity of approaches used is indicative of the complexity of the trait. Early studies at the beginning of the 20th century mainly dealt with the observation of the phenomenon itself and the effects of dormancy alleviating molecules. In the 70s, advances in microscopy and subcellular techniques allowed novel observations of cellular modifications over the dormancy period. Later, between 1980 and 2000, physiological studies including metabolic analyses led to further description of the main pathways involved, more recently highlighted by genetic and genomic studies. Numerous studies, notably transcriptomic analyses, have led to the identification of common molecular pathways regulating bud dormancy in trees (Rohde et al., 2007; Ruttink et al., 2007; Yamane et al., 2008; Jiménez et al., 2010; Leida et al., 2010; El Kayal et al., 2011; Liu et al., 2012; Bai et al., 2013; Zhong et al., 2013; Xu et al., 2016; Tarancón et al., 2017). Specific gene expression patterns over the course of dormancy featured hormone signaling, carbon metabolism, stress response and chromatin modification (Regier et al., 2010; Rios et al., 2014; Saito et al., 2015; Wisniewski et al., 2015; Wen et al., 2016). Among the main pathways identified, the Dormancy-Associated MADS-BOX (DAM) genes have been a constant interest since they were proposed to cause the non-dormant phenotype of the *evg* mutant of peach (Rodriguez et al., 1994; Bielenberg et al., 2004, 2008; Howe et al., 2015). In peach, the six tandem-arrayed DAM genes display distinct seasonal patterns with peaks in expression at different times during dormancy (Li et al., 2009), supporting their role in promoting and maintaining dormancy (Jiménez et al., 2010; Hao et al., 2015). Following this finding, DAM genes and their involvement in dormancy have been extensively studied in perennial plants including leafy spurge (Horvath et al., 2008; Anderson et al., 2010), apple (Mimida et al., 2015), Japanese pear (Ubi et al., 2010; Saito et al., 2013), tea plant (Hao et al., 2017), Kiwifruit (Wu et al., 2017), and Japanese apricot (Yamane et al., 2008; Sasaki et al., 2011). In poplar, genes homologous to *CONSTANS* (CO) and *FLOWERING LOCUS T* (FT) have key roles in the control of dormancy (Böhlenius et al., 2006; Hsu et al., 2011; Srinivasan et al., 2012) and the chill-induced release of endodormancy (Rinne et al., 2011). Recent reviews have nicely described the molecular advances in dormancy studies (Cooke et al., 2012; Rios et al., 2014; Sanchez-Perez et al., 2014) therefore we will not focus our attention

on these aspects. Overall, all these pathways are interconnected in a very complex manner and so far no integrative scenario has been proposed to precisely describe their interactions. Nonetheless one particular pathway seems central and is almost always highlighted in the recent studies: the response to oxidative stress and the reactive oxygen species (ROS). Notably, most of the studies using dormancy release substances such as HC (Hydrogen Cyanamide) show they induce the ROS scavenging systems. Interestingly, ROS are also thought to be a key signal during plant development for many aspects including dormancy (Considine and Foyer, 2014), as shown by their link to the hormonal interplay, cell wall loosening, and ion channels in seeds. Here, we review both early and recent findings on the dormancy processes in buds of temperate fruit trees species including hormonal signaling, the role of plasma membrane, carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration and oxidative stress, with an effort to link them together and emphasize the central role of ROS accumulation in the control of endo- and ecodormancy progression.

III.2. Oxidative Stress and Redox Cues

In contrast to chilling-induced breaking of dormancy, exposing dormant buds to sub-lethal freezing and high temperatures as well as other sub-lethal treatments for a short period of time can overcome rest relatively rapidly (Orffer and Goussard, 1980; Nee and Fuchigami, 1992). Following these observations, numerous lines of evidence have highlighted that stresses, especially oxidative and respiratory stresses, are involved in the release of buds from dormancy. These stresses trigger the production of ROS, which have been shown to be critical throughout plant life and development (Considine and Foyer, 2014). This production of ROS including H₂O₂ in buds suggests that they may act as key signaling molecules for dormancy release (Kuroda et al., 2002, 2005; Pérez and Burgos, 2004; Prassinis et al., 2011; Vergara et al., 2012; Hussain et al., 2015; Tan et al., 2015). These hypotheses are further supported by observations that exogenous H₂O₂ can substitute for chilling, thus confirming that an increase in H₂O₂ levels may activate the sequence of reactions involved in the breaking of bud dormancy (Pérez and Burgos, 2004; Kuroda et al., 2005; Pérez et al., 2008). Conversely, treatment of potato tuber with a NADPH oxidase inhibitor leads to decreased ROS production and delayed dormancy release (Liu et al., 2017). In plant cells, ROS are continuously produced as a consequence of aerobic metabolism in all the intracellular organelles. Cells have the capacity to rapidly produce and scavenge different forms of ROS levels, as a result of a balance between formation and detoxification rates, with a tight link to cellular metabolism, making ROS good signals to monitor changes in cellular metabolism (Mittler et al., 2011). Another indication that oxidative stress is an important part of the process of

dormancy is that antioxidant defense and detoxification pathways are upregulated during dormancy release, including catalase (CAT), glutathione peroxidase (GR), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase superfamily proteins (Scalabrelli et al., 1991; Or et al., 2000; Halaly et al., 2008; Leida et al., 2010; Prassinis et al., 2011; Vergara et al., 2012; Viti et al., 2012; Bai et al., 2013; Zhuang et al., 2013; Guzicka et al., 2017). This is especially true for buds treated with dormancy-breaking compounds. In apricot flower buds, gibberellic acid 4 (GA4) treatment upregulates oxidation-reduction proteins and the authors hypothesized that GA4 application led to the development of oxidative stress and to subsequent dormancy release (Zhuang et al., 2013). HC has been widely used by growers to overcome low and uneven bud break and the mechanisms that underlies its dormancy-breaking effect is extensively studied in fruit species. Many studies show that a significant increase in H₂O₂ levels is the main metabolic change produced by HC, often linked to an inhibition of CAT activity (Bartolini et al., 1996; Pérez and Lira, 2005; Halaly et al., 2008; Pérez et al., 2009; Tan et al., 2015). However, recent genomic studies show that a wide range of genes is differentially regulated after HC application such as genes related to cell wall loosening, hormonal response, carbohydrate and protein metabolism (Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Liu et al., 2015; Sudawan et al., 2016; Ionescu et al., 2017) thus linking oxidative stress, mitochondrial activity, hypoxia, cytokinins, auxin, jasmonate and ethylene signaling pathways to HC-induced dormancy release. Based on these findings, HC application is thought to trigger transient oxidative stress and activate detoxification systems. Subsequently, most pathways proposed to be involved in dormancy release are activated: degradation of callose, inhibition of abscisic acid (ABA), GAs, glycolysis, cytokinins (Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Zheng et al., 2015; Ionescu et al., 2017). Another clue for the involvement of ROS during dormancy is the response of several ROS scavenging systems that were closely analyzed during bud dormancy. The glutathione and ascorbate pathways are crucial for the detoxification of H₂O₂. The overall content of glutathione was shown to increase in concomitance with the endodormancy overcoming. Moreover, the ratio between reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, was reported to be associated to the dormancy stage: higher levels of GSH at the end of rest compared to beginning of the phase (Siller-Cepeda et al., 1992; Wang and Faust, 1994; Kocsy et al., 2001; Bartolini et al., 2006). This ratio has been shown to be under the control of the glutathione reductase (GR) activity in Japanese pear (Zanol et al., 2010). In dormant grapevine buds, HC upregulates genes involved in ascorbate, glutathione and pentose phosphate pathway (PPP) detoxification pathways (Pérez et al., 2009; Sudawan et al., 2016). Temporary induction of the PPP in response to oxidative stress may provide a way to recharge the system with

NADPH for detoxification through the ascorbate/glutathione system (Figure 1). Such an induction has been observed in apricot buds after a treatment with GA4 (Zhuang et al., 2015), thus allowing the production of NADPH in the absence of mitochondrial respiration. All these studies provide evidence that ROS play a crucial role during dormancy and raise the questions of the mechanism involved in the oxidation system, especially how other pathways interact or are directly controlled by oxidative cues.

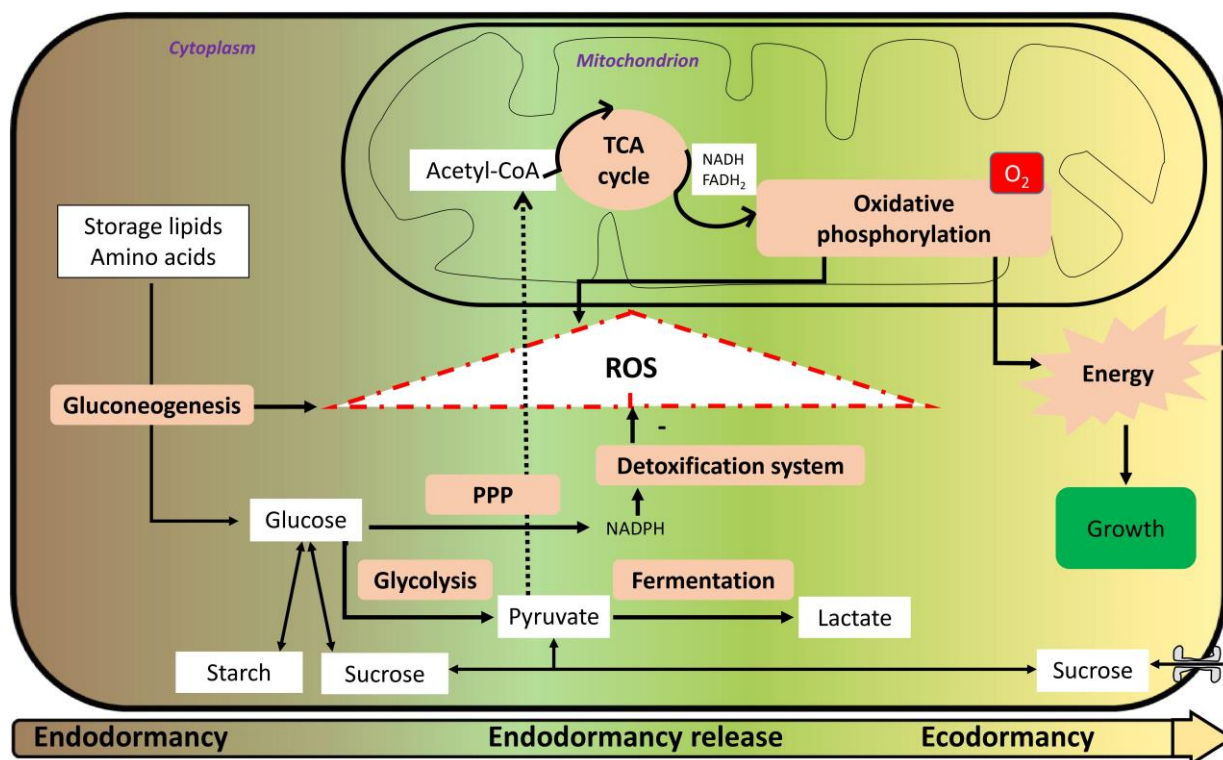


Figure 1: Metabolism and ROS formation from endodormancy until ecodormancy.

III.3. Mitochondrial Respiration

Mitochondrial respiration is the primary cellular source of ROS on non-photosynthetic tissues in the context of healthy conditions (Van Aken et al., 2009), whereas plasma membrane and cell-wall NADPH/NADH oxidases are major producers in the context of defense response (Davies et al., 2006). An elevation of ROS production is noted in abnormal conditions, such as hypoxia or hyperoxia (Turrens, 2003). During dormancy, hypoxia and the inhibition of mitochondrial respiration can be responsible for the increase in ROS content observed in dormant buds (Vergara et al., 2012; Meitha et al., 2015, 2018), potentially by activating gluconeogenesis, and therefore enhances grape bud dormancy release (Ophir et al., 2009; Rubio et al., 2014; Sudawan et al., 2016). Likewise, O₂ deprivation raises glycolysis and ethanolic fermentation which could lead to the production of ROS (Pérez et al., 2009). Moreover, treatment of isolated grape bud mitochondria with sodium azide, another dormancy release molecule, inhibited O₂ uptake (Pérez et al., 2009) and mitochondria under

hypoxia have been shown to have less TCA cycle enzyme activities and reduced ATP production in maize and potato (Considine et al., 2017). In response to shortening photoperiod and low temperature, respiration may be impaired as part of the growth cessation and dormancy onset processes. For example, ABA, which participates to dormancy maintenance, has been shown to inhibit certain isoforms of the tricarboxylic acid (TCA) cycle isozymes in floral buds of peach (Oncelay et al., 1979) or sucrose transporters in vine (Murcia et al., 2015), thus comforting the hypotheses that respiration processes are affected during dormancy. All these elements suggest that a respiratory stress must be involved in the release of buds from dormancy through abnormal positive net production of ROS.

Regulation of respiration is central to the transition from rest to metabolically active state, generating the ATP needed for cell functioning and growth. In aerobic respiration, mitochondria carry out the final steps of this process and generate the bulk of ATP through (i) the TCA cycle, (ii) the oxidative phosphorylation electron chain, (iii) the alternative oxidase (AOX), and (iv) the set of carriers and channels that provide the substrates and cofactors from the cytosol. Respiration rate and depth of dormancy were shown to be inversely related in grapevine buds (Parada et al., 2016), associated with contrasted response to temperature and glucose, two stimuli that normally increase respiration in plant tissues. While respiration in non-dormant buds rose sharply in response to both stimuli, respiration in dormant buds was only slightly affected, thus suggesting that respiration is inhibited in dormant buds. Several processes can explain this repression of mitochondrial respiration during dormancy. Firstly, some studies report that mitochondria activity might be altered over dormancy progression, with modifications in their number (Felker et al., 1983) or their structure (Guzicka et al., 2017), and could be linked to availability of oxygen and requirements of oxidative phosphorylation (Considine et al., 2017). Thereafter, respiration in dormant bud cells might be affected. Secondly, as described before, dormant cells are subjected to carbon starvation and repression of cell-to-cell transport, coupled with bud scales that have low oxygen permeability. Analyses of gene expression and O₂ pressure measurements suggest that dormant buds reside in a hypoxic state and return to the oxygenated state during bud burst (Meitha et al., 2015). According to experiments on O₂ consumption and CO₂ production of grapevine twigs in hypoxic conditions (solution of chlorpromazine) or normal conditions, fermentation pathway has been suspected to be involved in dormancy release (Pouget, 1965). Recent findings on transcript abundance of key genes such as lactate dehydrogenase or alcohol dehydrogenase tend to confirm the activation of the fermentation pathway in dormant bud cells under chilling or dormancy-breaking reagent treatments (Or et al., 2000; Halaly et al., 2008; Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009), which is characteristic of low-oxygen

conditions. Furthermore, plasma membrane properties are modified during dormancy and we hypothesize that chill modifies the properties of membrane-bound proteins, as was shown for the succinate oxidase activity for mitochondria of Jerusalem artichoke tubers (Chapman et al., 1979): the Arrhenius activation energy was high during dormancy and decreased at the termination of dormancy. Finally, it has been proven that the level of ATP or the ATP/ADP ratio change over dormancy progression: low levels of ATP are characteristic of endodormancy while a steep rise in ATP/ADP ratio marks the end of ecodormancy (Bonhomme et al., 2000). The mitochondrial ATP synthase complex requires inorganic phosphate delivery by the mitochondrial phosphate transporter (MTP). The expression level of MPT is low during dormancy and up-regulated to promote respiratory rate and energy metabolism for bud dormancy release in tree peony (Huang et al., 2008; Zhang et al., 2016). These results are consistent with the hypothesis that phosphate is compartmentalized during dormancy (Bonhomme et al., 2000) leading to the inhibition of respiration and ATP production.

According to all these knowledge, the role of the mitochondrial respiration during the different phases of dormancy is proposed in Figure 1: during endodormancy, hypoxia and the inhibition of mitochondrial respiration can be responsible for the increase in ROS content that reach a maximum at the endodormancy release, and at this stage, recovery of mitochondrial respiration during the ecodormancy period.

III.4. Carbohydrates Metabolism

In addition to the role of mitochondrial respiration toward positive ROS production, carbohydrate metabolism seems to be crucial for ROS systems. During dormancy, a carbon starvation is noted, and glucose is a key molecule. It may be produced via storage molecules such as lipids, notably through beta-oxidation and neoglucogenesis, responsible for a net ROS production (Dieuaide et al., 1992). On one hand, glucose may be processed in the glycolysis and then metabolized in the mitochondria for ROS production; on the other hand, it may be processed through the PPP to yield reducing power and participate to ROS detoxification. For example, in yeast, it has been shown that low glucose amounts induce a decreased mitochondrial ROS production (Barros et al., 2004). Interestingly, it has been shown that a switch from glycolysis to PPP during germination in Arabidopsis seed is a scavenging system for oxidative stress (Arc et al., 2011).

In addition to its crucial role in the response to cold, carbohydrate metabolism appears essential in the transition from dormancy to active bud growth (Figure 1), as suggested by

Park et al. (2009) and Signorelli et al. (2018). Changes in carbohydrate dynamics were linked to changes in dormancy status in sweet cherry with a degradation of starch into soluble sugars during dormancy onset and an increase in starch just before budburst (Kaufmann and Blanke, 2017). In parallel with starch dynamics, soluble sugars were shown to increase between autumn and winter followed by a significant decrease between winter and spring (Charrier et al., 2017). The bud capacity to burst is tightly linked to its supply in carbohydrates and as described previously, the carbohydrate uptake capacity increases in the bud after dormancy release with an increase in the expression and activity of plasma membrane transporters. Just before budburst, all sugars are transported in the sap toward the buds but during endodormancy, carbohydrate dynamics are restricted to the bud tissues. Tarancón et al. (2017) proposed that growth cessation and bud dormancy are consequences of carbon supply starvation syndrome linked to the sugar deficit. Over dormancy progression, and in response to winter conditions, soluble compounds (sucrose, glucose) are synthesized from the reserves accumulated during the growing season, such as starch grains (Felker et al., 1983; Guzicka, 2001; Xu et al., 2016; Guzicka et al., 2017). Interestingly, poplars overexpressing sucrose phosphate synthase – which accumulate more sucrose and starch than the wild-type poplars – are characterized by accelerated bud break, raising the possibility that enhanced sugar and/or starch reserves can promote accelerated dormancy breaking (Park et al., 2009). However, in the context of low carbon supply, it is possible that the gluconeogenesis pathway is activated to produce glucose from non-carbohydrate sources (Figure 1) as reported by Ruttink et al. (2007), associated with the generation of ROS. Similar pathway was described in dormant seeds (Einali and Valizadeh, 2017). In addition, a recent study showed that sucrose was synthesized during GA4-induced dormancy release (Zhuang et al., 2015), thus confirming the link between soluble sugars content and end of endodormancy.

During dormancy, glucose is metabolized in at least three pathways involved in the cell processes: the PPP leading to a detoxification system, glycolysis that synthesizes the pyruvate necessary for mitochondrial respiration, and fermentation producing lactate (Figure 1). We propose that the balance between all three pathways is key in the control of dormancy release.

III.5. Hormonal Signaling

Phytohormones are plant molecules that are produced within the plant and control most, if not all, developmental aspects of plant life (Davies, 2013). ROS and hormones have been shown to act in an interdependent manner (Barba-Espin et al., 2010; Bahin et al., 2011; Oracz and Karpiński, 2016). For

example, a recent study has shown this close link between the pathways with an inhibition of ROS formation by ABA, and a promotion of ROS formation by gibberellins (GAs) in seeds during cold stratification (Amooaghaie and Ahmadi, 2017), and conversely ROS mediate ABA and GA regulation through their catabolism and biosynthesis, respectively (Liu et al., 2010).

Hormonal pathways, including ABA, GAs, ethylene, auxin and cytokinins, have been demonstrated to be of great importance in the bud dormancy process (Mielke and Dennis, 1978; Rodríguez and Sánchez-Tamés, 1986; Wang et al., 1987; Piola et al., 1998; Ophir et al., 2009; Doğramacı et al., 2013; Zhuang et al., 2013; Wen et al., 2016; Signorelli et al., 2018). Auxins were reported to be present at different concentration in buds throughout dormancy progression. Dormancy onset and cold treatment induces a reduction in auxin while quantity of auxins rises in ecodormancy until budburst as shown in hazelnuts (Rodríguez and Sánchez-Tamés, 1986) and grapevine (Aloni et al., 1990). It has been shown that auxins can be oxidized by two mechanisms in plants, a H₂O₂-dependent pathway, and a molecular dioxygen pathway, via peroxidases and membrane-bound NADPH oxidases (Pfeiffer and Höftberger, 2001; Kawano, 2003). Oxidation of auxin may thus yield ROS and be part of their generation during endodormancy progression. In addition, it has been shown in apple that genes related to auxin transport are major regulators of dormancy (Porto et al., 2015), and thus we could make the hypothesis that auxins may be involved to the propagation of the ROS signal through different territories, as this ROS signal propagation has been shown in grape buds during bud bursting (Meitha et al., 2015). Transcriptomic analyses of dormant buds suggest that brassinosteroid, salicylic-acid-, and jasmonic-acid-associated genes are differentially regulated during dormancy (Howe et al., 2015). The ethylene pathway is interesting when focusing on dormancy and oxidative stress signaling. Indeed, ethylene induced bud break in grapevine buds (Ophir et al., 2009) and low-temperature stress and HC treatment, closely linked to oxidative cues as stated before, provoke ethylene biosynthesis, associated with chilling requirement and dormancy release in peach and sweet cherry (El-Shereif et al., 2006; Del Cueto et al., 2017). In addition, the ethylene biosynthesis pathway, starting with ethylene precursors methionine and ACC, increases during endodormancy, resulting in the production of ethylene but also of hydrogen cyanide, therefore leading to increased levels of ROS (Ionescu et al., 2017). In seed dormancy, ABA and GAs act antagonistically thus it is not surprising that both pathways and their interaction have been closely studied in the context of bud dormancy (Rodríguez-Gacio Mdel et al., 2009). ABA has been demonstrated to promote shoot growth cessation and bud dormancy establishment (Le Bris et al., 1999; Guak and Fuchigami, 2001) whereas GA promotes growth and dormancy release (Rinne et al., 2011). In fruit trees, increases in bud ABA content have been reported at the beginning of endodormancy in the fall (Götz et al., 2014; Wang et al., 2016; Tuan et al., 2017; Li et al., 2018) followed by a rapid drop in response to cold (Leida et al., 2012) or dormancy-breaking agents (Seif El-Yazal et al., 2014; Zheng et al., 2015), accompanied by changes in the expression of genes related to ABA biosynthesis and degradation.

Several studies showed that the expression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases (NCED), involved in ABA synthesis, is activated during dormancy induction and maintenance (Fennell et al., 2015; Wang et al., 2016; Chao et al., 2017; Li et al., 2018). In addition, after chilling requirements are satisfied, ABA levels decrease under the control of ABA 8'-hydroxylase (encoded by CYP707A), which is up-regulated during dormancy release (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2016; Tuan et al., 2017; Li et al., 2018). Alternatively, inhibition of active ABA might be related to the production of conjugated forms of ABA that increases in response to cold temperatures: glucose ester of ABA (ABA-GE) in *Vitis* (Koussa et al., 1994) and an ABA-isomer in cherry (Götz et al., 2014). Interestingly, recent studies have indicated that early cultivars of Japanese apricot contained less ABA during dormancy than late cultivars (Wen et al., 2016), thus suggesting a dose-dependent control of dormancy. Interestingly, a close relationship between ABA and ROS has been shown not only during stomatal closure but also for seed dormancy. Notably, exogenous ROS application diminished ABA concentration in barley seeds during the after-ripening period (Wang et al., 1998), and increased its catabolism by up-regulating CYP707A genes in *Arabidopsis* during seed imbibition (Liu et al., 2010). Moreover, treatment of sunflower seeds during this after-ripening period enhances ROS production (Oracz et al., 2007), similarly to many studies including HC treatment on bud in various species. Thus, even though no studies have demonstrated these connections of ROS and ABA in buds, they are well known in various seed tissues. Therefore, as proposed by Leida et al. (2012), similar mechanisms may occur in bud dormancy. More precisely, we may compare the seed after-ripening period with bud endodormancy stage, while the imbibition process in seed may be similar to the ecodormancy period in buds. Nevertheless, the effect of ABA on bud dormancy is still not entirely understood, and ABA may control growth inhibition rather than play a direct role on dormancy regulation as suggested by Ramina et al. (1995) when they did not identify any strict relationship between ABA quantity and dormancy release in peach buds. Sensitivity to ABA may fluctuate as well, as shown in dormant pea seedling, where ROS inhibits the ABA signaling pathway during the imbibition period (Meinhard and Grill, 2001; Barba-Espin et al., 2010).

Gibberellic acids are particularly important as they may act in the growth renewal process during dormancy release. In fruit trees, several studies pointed out their implication in the control of dormancy progression, although few studies quantified them directly, but focused on their metabolism and on the effect of exogenous application. GA application may even substitute for chilling (Brown et al., 1960; Saure, 1985; Reinoso et al., 2002; Rinne et al., 2011; Zhuang et al., 2013) and GAs synthesis is promoted by dormancy breaking reagents (Seif El-Yazal et al., 2014). Nevertheless, the highest levels of GA1 and GA3 were found in dormant buds during endodormancy release and diminished afterwards (Luna et al., 1990; Wen et al., 2016). Overall, this is supported by expression analyses, with the up-regulation of GA3-oxidase (GA3ox) and GA20-oxidase (GA20ox), responsible for bioactive GA synthesis, under chilling treatment (Rinne et al., 2011) or around

dormancy release (Bai et al., 2013; Wen et al., 2016). GA2-oxidase (GA2ox) genes, which encode the enzymes responsible for the deactivation of bioactive GA4 and GA1, are upregulated during dormancy and dormancy release in Japanese apricot buds (Yamane et al., 2008) but during ecodormancy as well in Japanese pear (Bai et al., 2013). Thus it appears that GAs regulation is tightly balanced between production and degradation, and they might enhance growth rate when the conditions are favorable. Interestingly, endogenous ROS application enhances endogenous GA concentration in Arabidopsis seed (Bahin et al., 2011) through diminution of its catabolism, and conversely GA4 application in apricot flower buds led to the development of oxidative stress and subsequent dormancy release (Zhuang et al., 2013). Thus there is obviously a tight link between ROS and GA, both influencing each other.

Taken as a whole, we can postulate that, similarly to seed dormancy, the hormonal balance between ABA and GA, which promotes dormancy and growth, respectively, may mediate the decision toward bud break, and as stated previously for different hormonal studies. Furthermore, as shown for the interaction between ethylene and ABA, ethylene modulating ABA degradation and signaling (Zheng et al., 2015), all hormonal pathways are interconnected and act together to control dormancy progression this balance may be directly influenced by ROS content, notably through redox control of the activity and symplasmic and apoplastic transport of plant growth regulator or transcriptions factors (Considine and Considine, 2016).

III.6. Plasma Membrane and Cell Wall Modifications

On another scale, modifications of membrane structure may be influenced by ROS concentration, or may be responsible for changing metabolism and thus may enhance ROS production. For example, O₂ diffusion through membranes may be more effective just before endodormancy release, inducing metabolism activity and then the increase of ROS production. On the other hand, as proposed above, ROS production may be caused by hypoxia. It is therefore essential to understand whether membrane modifications induce ROS production by raising metabolism as oxygen is more available, or if oxygen shortage generates ROS (Turrens, 2003). Molecular and metabolic changes associated with seasonal cycle of dormancy have been studied extensively in trees but structural changes at the cell level were less examined. Cells are organized in different compartments that enable their normal functioning. These compartments are delimited by membranes that are bilayers of complex lipids, partly permeable, associated with proteins (Figure 2). The stability of the membranes under cold stress highly depends on their functional and structural characteristics therefore the role of its components, lipids and proteins, is crucial. During winter, both dormancy and cold acclimation modify the cell structure and the two processes are usually difficult to separate. The lipid composition and membranous factors are modified during dormancy, notably to protect the cells from freezing-induced dehydration and lesions (Wang and Faust, 1990; Uemura and Steponkus,

1999). For example, it has been shown that the fluidity of the plasma membranes of bud cells in peach increases with chilling during dormancy release (Portrat et al., 1995), associated with a marked increase in total phospholipid content and in the relative level of linolenic acid (C18:3) (Erez et al., 1997). Moreover, low temperatures or thidiazuron, a growth regulator, increases the degree of unsaturation of fatty acids in the membrane lipids of apple buds, changes the polar head group composition, and changes sterol levels and composition (Wang and Faust, 1988, 1990). In addition, triggering dormancy release by GA4 application further confirmed that the composition in linoleic and linolenic acids are modified during dormancy progression (Zhuang et al., 2015).

Thus, winter cold temperatures lead to modifications in the membrane state as part of the cold acclimation process but also potentially the dormancy state. Nevertheless, no studies have been undertaken concerning the global lipid composition during the dormancy period with a lack of chilling, thus allowing a better understanding of the role of lipids over winter and spring rest. Studies investigating ultrastructure changes during dormancy are still rare but exceptions includes: plasmodesmata and lipid droplets analyses (Rinne and van der Schoot, 2004; Rinne et al., 2011; Paul et al., 2014) and cell wall thickening and an increase in vacuole precipitates during dormancy induction (Jian et al., 1997). Currently, no study has shown a direct relationship between ROS signaling and membrane modification in bud dormancy but analyses on seed germination have shown that hydroxyl radical OH⁻ had a direct role on degradation involved in cell wall loosening (Müller et al., 2009). Therefore, we can hypothesize that ROS signaling may be involved in downstream cell wall loosening during bud dormancy release and growth resumption.

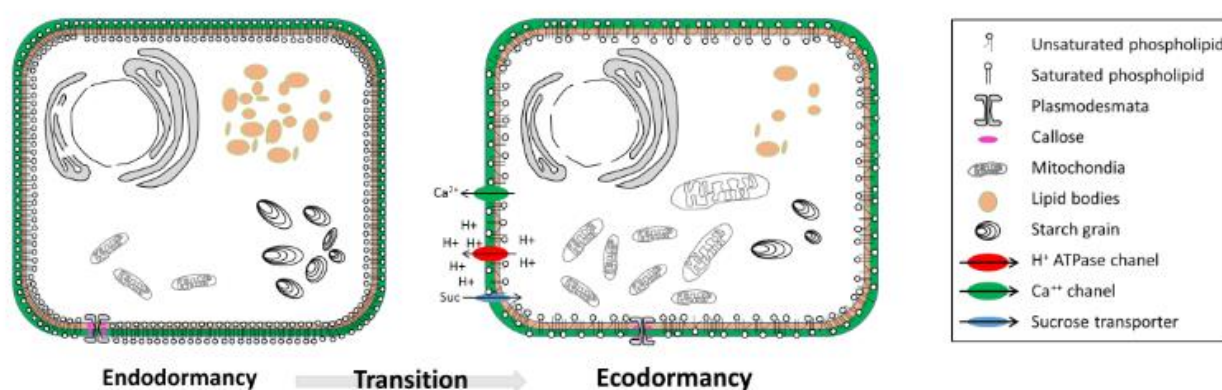


Figure 2: Cellular structure modifications from endodormancy to ecodormancy.

III.7. Role of Membrane Bound Transporters

Apart from the changes in the saturation level of the lipids and types of lipids, other properties of the membranes are modified over dormancy progression (Figure 2). In particular, movements through the plasma membrane and long-distance transport change in response to chilling. In peach for example, active absorption of sucrose and other nutrients is stopped when the bud is in a state of

deep dormancy while an active sucrose import was observed during growth resumption (Marquat et al., 1996). These modifications in cotransport H⁺/sucrose can be explained by structural changes of the plasma membrane (Wisniewski and Ashworth, 1986; Portrat et al., 1995), and more specifically by changes in ATPases activity (Giaquinta, 1979) (Figure 2). Plasma membrane H⁺ extrusion pumps (PM H⁺/ATPases) are key players in transport activity through their role in energizing solute transport (Alves et al., 2001) and studies revealed that H⁺/ATPases accumulation and activity are inhibited during endodormancy (Aue et al., 2000) but increase during endodormancy release or ecodormancy in peach (Gévaudant et al., 2001), walnut (Alves et al., 2007), and pear (Liu et al., 2012) (Figure 2). In the same time, the hydric status of buds varies characteristically with a marked dehydration in endodormancy and a water content increase in ecodormancy, just before budburst (Rinne et al., 1994; Yooyongwech et al., 2009; Götz et al., 2014; Kaufmann and Blanke, 2017). Water content was reported to increase in peach buds after a treatment with HC, a dormancy-breaking agent, suggesting that not only cold regulates the hydric status (Yooyongwech et al., 2012). The water status in buds is controlled by a range of membrane bound channels like aquaporins. Transcripts for two aquaporins showed differential spatiotemporal patterns in dormant peach buds in an interesting study by Yooyongwech et al. (2008). Their observations revealed that the activation of inter- and intra-cell communication through aquaporins resulted in a gradual increase in water content before growth resumption, which occurs earlier in low-chill cultivars than in high-chill cultivars.

Furthermore, connections between cells and organs over dormancy progression rely on the plasmodesmata functioning for carbohydrate and nutrient supply as well as signaling molecules. Plasmodesmata are not only essential for cell-to-cell transport, thus crucial for the bud functioning during dormancy, but they also control the supply route through the phloem between the buds and the shoot. Consequently, modifications of the transport activity by obstruction of the plasmodesmatal system lead to growth cessation, dormancy onset and dormancy release (Rinne and van der Schoot, 1998; Rinne et al., 2001; Xu et al., 2016). In their exhaustive review on plasmodesmata, Rinne and van der Schoot (2003) demonstrated the key role of plasmodesmata activity for symplasmic uncoupling and recoupling of vegetative bud cells during dormancy onset and dormancy release, respectively. In dormancy-inducing conditions, several studies have shown that callose (1,3-β-D-glucan) is deposited at the bottleneck region of plasmodesmata leading to diminished, if not stopped, transport and signaling between cells (Rinne et al., 2001). Net callose deposition is governed by the joint action of 1,3-β-glucansynthases and 1,3-β-glucanases (glucan hydrolase family 17, GH17), and shifts in the balance of these enzymes are central to the dormancy status and the growth potential of buds. Rinne et al. (2001, 2011) have hypothesized that the balance shifted toward net deposition as long as endodormancy lasts. Subsequently, during chilling-induced dormancy release, blocked plasmodesmata connections are restored within the bud by callose degradation. GAs seem to be implicated in the up-regulation of specific 1,3-β-glucanases involved in

orchestrating the chilling-induced callose breakdown to restore symplastic connections after endodormancy release (Rinne et al., 2011). By focusing on the ultra-structure of plasmodesmata Rinne et al. (2001) have shown that lipid bodies are targeted to the plasma membrane in close proximity to the plasmodesmata and may facilitate the restoration of plasmodesmata functionality (Rinne et al., 2011). Lipid droplets are membrane-bound storage organelles of universal occurrence. Recent analyses have suggested their role as signaling platforms that deliver proteins and signaling molecules (Murphy, 2012). In plants, they have been described as globules containing neutral lipids, triglycerids (TAG) or sterol esters, delimited by a phospholipid monolayer (Farese and Walther, 2009; Chapman et al., 2012). van der Schoot et al. (2011) and Paul et al. (2014) have hypothesized that in buds, lipid bodies function as a vehicle that delivers proteins to the plasmodesmata, including 1,3- β -glucanases to the callose deposits in order to restore plasmodesmata function (Rinne et al., 2011). Overall, explaining the establishment and release of dormancy by the dynamics of callose and plasmodesmata is tempting but genetic and molecular evidence to support this hypothesis are still lacking and causality remains unproven. Recently, observations on spruce embryonic shoots have revealed that callose was still detected in plasmodesmata during ecodormancy (Guzicka et al., 2017). Furthermore, recent studies on architecture and permeability of plasmodesmata have shed light on the fine mechanisms regulating cell-to-cell connectivity. They show that, although callose is a central regulator of plasmodesmata, it does not necessarily mediate all changes to connectivity and to the size exclusion limit (SEL) for the molecules (Tilsner et al., 2016; Nicolas et al., 2017).

To our knowledge, no published study has uncovered interactions between ROS signaling and intercellular transport during bud dormancy. However, these links have been firmly suggested in other systems. For example, *Nicotiana benthamiana* mutants exhibiting increased production of ROS also displayed higher plasmodesmal transport (Stonebloom et al., 2012). In *Arabidopsis*, a study measuring root cell permeability also supports the hypothesis that ROS amounts regulate plasmodesmata function: application of low concentrations of H₂O₂ increased plasmodesmata permeability whereas high H₂O₂ concentrations induced plasmodesmata closure (Rutschow et al., 2011). These results suggest that ROS may participate in promoting the formation and alteration of plasmodesmata, or callose deposit, thus controlling communication and transport. Rutschow et al. (2011) speculate that this signaling is linked to differential stress response: low amounts of ROS indicate mild stresses that might be mitigated by increased cellular transport while the response to extreme stressed revealed by acute ROS signals necessitates cellular isolation. For bud tissues, the question here is therefore which amount of ROS is produced during dormancy progression and release and how this signal is transduced for cellular transport.

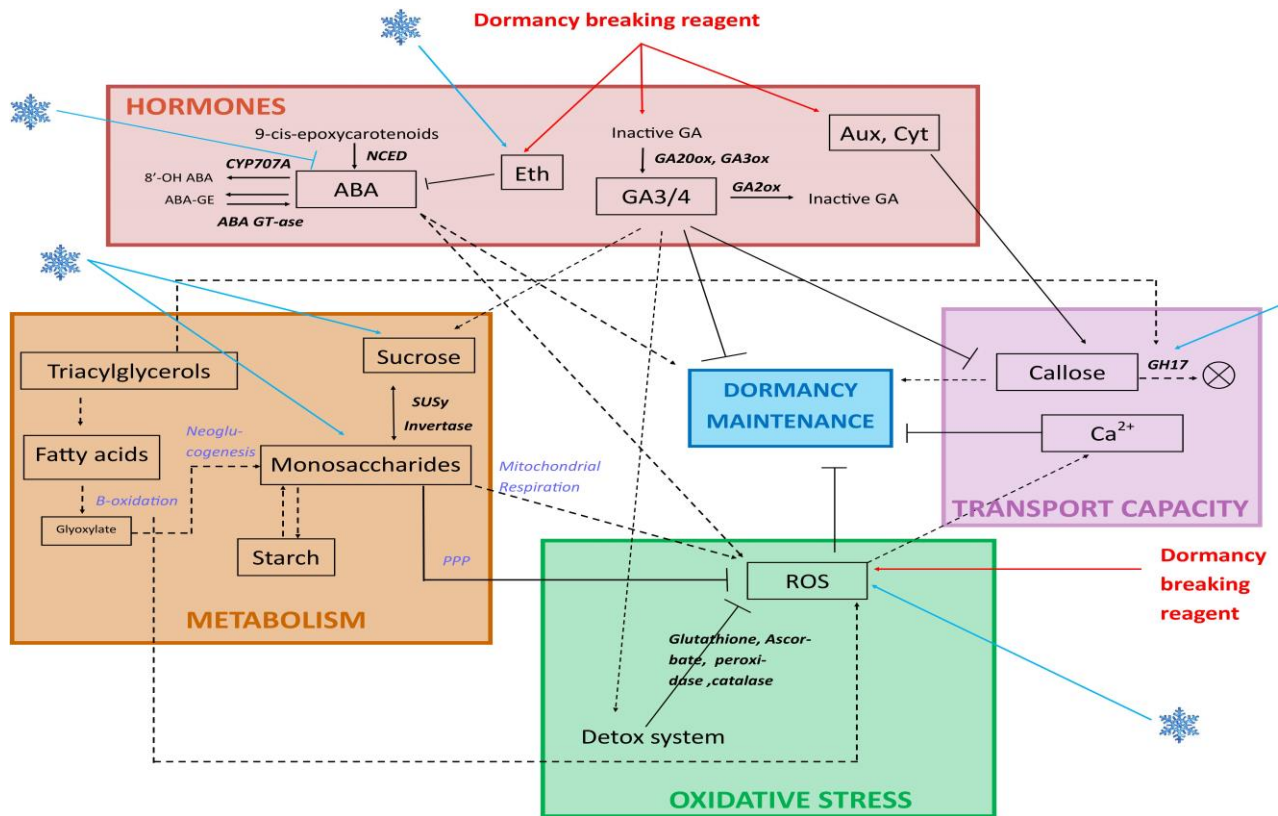


Figure 3: Main pathways involved in bud dormancy

Conclusion

Oxidative stress, carbohydrates metabolism highly linked to the mitochondrial respiration, hormones and transport capacity associated to plasma membrane and cell wall properties have been shown to play important roles in bud dormancy process. As these pathways interact between them, dormancy mechanism is very complex. The main pathways involved in bud dormancy are synthesized in Figure 3. Overall, these studies highlight the pivotal role of ROS production and detoxification systems for dormancy release. As a consequence of a combination of stresses and the decrease of cell metabolism, dormant buds accumulate ROS and their removal by scavenging and detoxification systems seems to be associated with breaking of dormancy. Implication of these mechanisms is further validated by the action of HC, potentially linked to the generation of sub-lethal oxidation stress. The question remains whether slow accumulation of ROS, as a consequence of winter temperatures and low metabolism, triggers dormancy release when a sub-lethal threshold is reached, or a prompt shift into stress-inducible conditions leads to a dormancy-alleviating response. In this case, the whole concept of chilling requirements could be questioned. Further studies are necessary to address these hypotheses, including the question of toxicity of dormancy-breaking treatments, in relation to ROS production.

Bibliography

- Aloni, R., Baum, S. F., and Peterson, C. A. (1990). The role of cytokinin in sieve tube regeneration and callose production in wounded coleus internodes 1. *Plant Physiol.* 93, 982–989. doi: 10.1071/PP9930601
- Alves, G., Améglio, T., Guilliot, A., Julien, J. L., Pétel, G., and Fleurat-Lessard, P. (2001). Cytological and immunological approach of vessel-associated cells in understanding the winter sugar exchanges, in walnut stems. *Acta Hortic.* 544, 295–300. doi: 10.17660/ActaHortic.2001.544.38
- Alves, G., Decourteix, M., Fleurat-Lessard, P., Sakr, S., Bonhomme, M., Améglio, T., et al. (2007). Spatial activity and expression of plasma membrane H⁺-ATPase in stem xylem of walnut during dormancy and growth resumption. *Tree Physiol.* 27, 1471–1480. doi: 10.1093/treephys/27.10.1471
- Amooaghaie, R., and Ahmadi, F. (2017). Triangular interplay between ROS, ABA and GA in dormancy alleviation of *Bunium persicum* seeds by cold stratification. *Russ. J. Plant Physiol.* 64, 588–599. doi: 10.1134/S1021443717040021
- Anderson, J. V., Horvath, D. P., Chao, W. S., and Foley, M. E. (2010). “Bud dormancy in perennial plants: a mechanism for survival,” in *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, eds E. Lubzens, J. Cerda, and M. Clark (Berlin: Springer), 69–90. doi: 10.1007/978-3-642-12422-8_5
- Arc, E., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., Lounifi, I., Job, D., et al. (2011). Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: how quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. *Proteomics* 11, 1606–1618. doi: 10.1002/pmic.201000641
- Aue, H.-L., Lecomte, I., and Pétel, G. (2000). Changes in parameters of the plasmalemma ATPase during peach vegetative bud dormancy. *Biol. Plant.* 43, 25–29. doi: 10.1023/A:1026538526649
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbineau, F., and Leymarie, J. (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 34, 980–993. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x
- Bai, S., Saito, T., Sakamoto, D., Fujii, H., and Moriguchi, T. (2013). Transcriptome analysis of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) flower buds transitioning through endodormancy. *Plant Cell Physiol.* 54, 1132–1151. doi: 10.1093/pcp/pct067
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., et al. (2010). Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environ.* 33, 981–994. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02120.x
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 49883–49888. doi: 10.1074/jbc.M408918200
- Bartolini, S., Vitagliano, C., Cinelli, F., and Scalabrelli, G. (1996). Effect of hydrogen cyanamide on apricot bud break and catalase activity. *Acta Hortic.* 441, 159–166.

- Bartolini, S., Zanol, G. C., and Viti, R. (2006). Changes in antioxidant compounds in flower buds of two apricot cultivars during winter season. *Acta Hortic.* 701, 69–74. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.701.7
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Fan, S., Reighard, G. L., Scorza, R., and Abbott, A. G. (2004). A deletion affecting several gene candidates is present in the evergrowing peach mutant. *J. Hered.* 95, 436–444. doi: 10.1093/jhered/esh057
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. L., et al. (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 Genet. Genomes* 4, 495–507. doi: 10.1007/s11295-007-0126-9
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., et al. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312, 1040–1043. doi: 10.1126/science.1126038
- Bonhomme, M., Rageau, R., and Gendraud, M. (2000). Influence of temperature on the dynamics of ATP, ADP and non-adenylic triphosphate nucleotides in vegetative and floral peach buds during dormancy. *Tree Physiol.* 20, 615–621. doi: 10.1093/treephys/20.9.615
- Brown, D., Griggs, W., and Iwakiri, B. (1960). The influence of gibberellin on resting pear buds. *Proc. Am. Soc. Hortic.* 76, 52–58.
- Chao, W. S., Doğramacı, M., Horvath, D. P., Anderson, J. V., and Foley, M. E. (2017). Comparison of phytohormone levels and transcript profiles during seasonal dormancy transitions in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Mol. Biol.* 94, 281–302. doi: 10.1007/s11103-017-0607-7
- Chapman, E., Wright, L. C., and Raison, J. K. (1979). Seasonal changes in the structure and function of mitochondrial membranes of artichoke tubers. *Plant Physiol.* 63, 363–366. doi: 10.1104/pp.63.2.363
- Chapman, K. D., Dyer, J. M., and Mullens, R. T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. *J. Lipid Res.* 53, 215–226. doi: 10.1194/jlr.R021436
- Charrier, G., Chuine, I., Bonhomme, M., and Ameglio, T. (2017). Assessing frost damages using dynamic models in walnut trees: exposure rather than vulnerability controls frost risks. *Plant Cell Environ.* 41, 1008–1021. doi: 10.1111/pce.12935
- Considine, M. J., and Considine, J. A. (2016). On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 3189–3203. doi: 10.1093/jxb/erw138
- Considine, M. J., Diaz-Vivancos, P., Kerchev, P., Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Gibbs, D. J., et al. (2017). Learning to breathe: developmental phase transitions in oxygen status. *Trends Plant Sci.* 22, 140–153. doi: 10.1016/j.tplants.2016.11.013
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326. doi: 10.1089/ars.2013.5665
- Cooke, J. E., Eriksson, M. E., and Junttila, O. (2012). The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ.* 35, 1707–1728. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x
- Davies, D. R., Bindschedler, L. V., Strickland, T. S., and Bolwell, G. P. (2006). Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from

- Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *J. Exp. Bot.* 57, 1817–1827. doi: 10.1093/jxb/erj216
- Davies, P. J. (2013). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Del Cueto, J., Ionescu, I. A., Pičmanová, M., Gericke, O., Motawia, M. S., Olsen, C. E., et al. (2017). Cyanogenic glucosides and derivatives in almond and sweet cherry flower buds from dormancy to flowering. *Front. Plant Sci.* 8:800. doi: 10.3389/fpls.2017.00800
- Dieuaide, M., Brouquisse, R., Pradet, A., and Raymond, P. (1992). Increased Fatty Acid β -Oxidation after glucose starvation in maize root tips. *Plant Physiol.* 99, 595–600. doi: 10.1104/pp.99.2.595
- Doğramacı, M., Foley, M. E., Chao, W. S., Christoffers, M. J., and Anderson, J. V. (2013). Induction of endodormancy in crown buds of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) implicates a role for ethylene and cross-talk between photoperiod and temperature. *Plant Mol. Biol.* 81, 577–593. doi: 10.1007/s11103-013-0026-3
- Einali, A., and Valizadeh, J. (2017). Storage reserve mobilization, gluconeogenesis, and oxidative pattern in dormant pistachio (*Pistacia vera* L.) seeds during cold stratification. *Trees* 31, 659–671. doi: 10.1007/s00468-016-1498-y
- El Kayal, W., Allen, C. C., Ju, C. J., Adams, E., King-Jones, S., Zaharia, L. I., et al. (2011). Molecular events of apical bud formation in white spruce. *Picea glauca*. *Plant Cell Environ.* 34, 480–500. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02257.x
- El-Shereif, A. R., Mizutani, F., Onguso, J. M., and Sharif Hossain, A. B. M. (2006). Influence of different temperatures on bud break and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of young peach trees. *Acta Physiol. Plant.* 28, 459–463. doi: 10.1007/BF02706629
- Erez, A., Wang, S. Y., and Faust, M. (1997). Lipids in peach buds during dormancy, a possible involvement in dormancy control. *Adv. Hortic. Sci.* 11, 128–132.
- Farese, R. V., and Walther, T. C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855–860. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.005
- Felker, F. C., Robitaille, H. A., and Hess, F. D. (1983). Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds. *Am. J. Bot.* 70, 376–386. doi: 10.2307/2443246
- Fennell, A. Y., Schlauch, K. A., Gouthu, S., Deluc, L. G., Khadka, V., Sreekantan, L., et al. (2015). Short day transcriptomic programming during induction of dormancy in grapevine. *Funct. Plant Ecol.* 6:834. doi: 10.3389/fpls.2015.00834
- PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar
- Gévaudant, F., Pétel, G., and Guilliot, A. (2001). Differential expression of four members of the H⁺-ATPase gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. *Planta* 212, 619–626. doi: 10.1007/s004250000438
- Giaquinta, R. T. (1979). Phloem Loading of Sucrose. *Plant Physiol.* 63, 744–748. doi: 10.1104/pp.63.4.744

- Götz, K.-P., Chmielewski, F.-M., Homann, T., Huschek, G., Matzneller, P., and Rawel, H. M. (2014). Seasonal changes of physiological parameters in sweet cherry (*Prunus avium* L.) buds. *Sci. Hortic.* 172, 183–190. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.012
- Guak, S., and Fuchigami, L. H. (2001). Effects of applied ABA on growth cessation, bud dormancy, cold acclimation, leaf senescence and N mobilization in apple nursery plants. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 459–464. doi: 10.1080/14620316.2001.11511394
- Guzicka, M. (2001). Changes in starch distribution within an embryonic shoot of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] before resumption of mitotic activity. *Dendrobiology* 46, 27–31.
- Guzicka, M., Pawłowski, T. A., Staszak, A., Rożkowski, R., and Chmura, D. J. (2017). Molecular and structural changes in vegetative buds of Norway spruce during dormancy in natural weather conditions. *Tree Physiol.* doi: 10.1093/treephys/tpx156 [Epub ahead of print].
- Halaly, T., Pang, X., Batikoff, T., Crane, O., Keren, A., Venkateswari, J., et al. (2008). Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* 228, 79–88. doi: 10.1007/s00425-008-0720-6
- Hao, X., Chao, W., Yang, Y., and Horvath, D. (2015). Coordinated expression of FLOWERING LOCUS T and DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX-Like genes in Leafy Spurge. *PLoS One* 10:e0126030. doi: 10.1371/journal.pone.0126030
- Hao, X., Yang, Y., Yue, C., Wang, L., Horvath, D. P., and Wang, X. (2017). Comprehensive transcriptome analyses reveal differential gene expression profiles of *Camellia sinensis* axillary buds at para-, endo-, ecodormancy, and bud flush stages. *Front. Plant Sci.* 8:553. doi: 10.3389/fpls.2017.00553
- Horvath, D. P., Chao, W. S., Suttle, J. C., Thimmapuram, J., and Anderson, J. V. (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. doi: 10.1186/1471-2164-9-536
- Howe, G. T., Horvath, D. P., Dharmawardhana, P., Priest, H. D., Mockler, T. C., and Strauss, S. H. (2015). Extensive transcriptome changes during natural onset and release of vegetative bud dormancy in *Populus*. *Funct. Plant Ecol.* 6:989. doi: 10.3389/fpls.2015.00989
- Hsu, C.-Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., et al. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10756–10761. doi: 10.1073/pnas.1104713108
- Huang, X., Zhu, W., Dai, S., Gai, S., Zheng, G., and Zheng, C. (2008). The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Planta* 228, 545–552. doi: 10.1007/s00425-008-0757-6
- Hussain, S., Niu, Q., Yang, F., Hussain, N., and Teng, Y. (2015). The possible role of chilling in floral and vegetative bud dormancy release in *Pyrus pyrifolia*. *Biol. Plant.* 59, 726–734. doi: 10.1007/s10535-015-0547-5
- Ionescu, I. A., López-Ortega, G., Burow, M., Bayo-Canha, A., Junge, A., Gericke, O., et al. (2017). Transcriptome and metabolite changes during hydrogen cyanamide-induced floral bud break in sweet cherry. *Front. Plant Sci.* 8:1233. doi: 10.3389/fpls.2017.01233
- Jian, L., Li, P. H., Sun, L., and Chen, T. H. (1997). Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca²⁺ in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J. Exp. Bot.* 48, 1195–1207. doi: 10.1093/jxb/48.6.1195

- Jiménez, S., Reighard, G. L., and Bielenberg, D. G. (2010). Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Mol. Biol.* 73, 157–167. doi: 10.1007/s11103-010-9608-5
- Kaufmann, H., and Blanke, M. (2017). Changes in carbohydrate levels and relative water content (RWC) to distinguish dormancy phases in sweet cherry. *J. Plant Physiol.* 218, 1–5. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.004
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* 21, 829–837. doi: 10.1007/s00299-003-0591-z
- Kocsy, G., von Ballmoos, P., Rügsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., and Brunold, C. (2001). Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol.* 127, 1147–1156. doi: 10.1104/pp.010107
- Koussa, T., Broquedis, M., and Bouard, J. (1994). Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la phase de levée de dormance. *Vitis* 33, 63–67.
- Kuroda, H., Sugiura, T., and Ito, D. (2002). Changes in hydrogen peroxide content in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in relation to breaking of endodormancy. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 71, 610–616. doi: 10.2503/jjshs.71.610
- Kuroda, H., Sugiura, T., and Sugiura, H. (2005). Effect of Hydrogen peroxide on breaking endodormancy in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 74, 255–257. doi: 10.2503/jjshs.74.255
- Lang, G., Early, J., Martin, G., and Darnell, R. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience* 22:377.
- Le Bris, M., Michaux-Ferrière, N., Jacob, Y., Poupet, A., Barthe, P., Guigonis, J.-M., et al. (1999). Regulation of bud dormancy by manipulation of ABA in isolated buds of *Rosa hybrida* cultured in vitro. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 273–281. doi: 10.1071/PP98133
- Leida, C., Conejero, A., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2012). Chilling-Dependent release of seed and bud dormancy in peach associates to common changes in gene expression. *PLoS One* 7:e35777. doi: 10.1371/journal.pone.0035777
- Leida, C., Terol, J., Martí, G., Agustí, M., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2010). Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiol.* 30, 655–666. doi: 10.1093/treephys/tpq008
- Li, J., Xu, Y., Niu, Q., He, L., Teng, Y., and Bai, S. (2018). Absciscic Acid (ABA) promotes the induction and maintenance of Pear (*Pyrus pyrifolia* White Pear Group) flower bud endodormancy. *Int. J. Mol. Sci.* 19:E310. doi: 10.3390/ijms19010310
- Li, Z., Reighard, G. L., Abbott, A. G., and Bielenberg, D. G. (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, 3521–3530. doi: 10.1093/jxb/erp195
- Liu, B., Zhang, N., Wen, Y., Jin, X., Yang, J., Si, H., et al. (2015). Transcriptomic changes during tuber dormancy release process revealed by RNA sequencing in potato. *J. Biotechnol.* 198, 17–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.019

- Liu, B., Zhao, S., Tan, F., Zhao, H., Wang, D., Si, H., et al. (2017). Changes in ROS production and antioxidant capacity during tuber sprouting in potato. *Food Chem.* 237, 205–213. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.107
- Liu, G., Li, W., Zheng, P., Xu, T., Chen, L., Liu, D., et al. (2012). Transcriptomic analysis of ‘Suli’pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) buds during the dormancy by RNA-Seq. *BMC Genomics* 13:700. doi: 10.1186/1471-2164-13-700
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., and Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61, 2979–2990. doi: 10.1093/jxb/erq125
- Luna, V., Lorenzo, E., Reinoso, H., Tordable, M. C., Abdala, G., Pharis, R. P., et al. (1990). Dormancy in Peach (*Prunus persica* L.) flower buds: I. Floral morphogenesis and endogenous gibberellins at the end of the dormancy period. *Plant Physiol.* 93, 20–25. doi: 10.1104/pp.93.1.20
- Marquat, C., Petel, G., and Gendraud, M. (1996). Study of H⁺-nutrient co-transport in peach-tree and the approach to their involvement in the expression of vegetative bud growth capability. *J. Plant Physiol.* 149, 102–108. doi: 10.1016/S0176-1617(96)80180-5
- Meinhard, M., and Grill, E. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 508, 443–446. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03106-4
- Meitha, K., Agudelo-Romero, P., Signorelli, S., Gibbs, D. J., Considine, J. A., Foyer, C. H., et al. (2018). Developmental control of hypoxia during bud burst in grapevine. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.13141 [Epub ahead of print].
- Meitha, K., Konnerup, D., Colmer, T. D., Considine, J. A., Foyer, C. H., and Considine, M. J. (2015). Spatio-temporal relief from hypoxia and production of reactive oxygen species during bud burst in grapevine (*Vitis vinifera*). *Ann. Bot.* 116, 703–711. doi: 10.1093/aob/mcv123
- Mielke, E. A., and Dennis, F. G. (1978). Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). III. Effects of leaves, defoliation and temperature on levels of abscisic acid in flower primordia. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 103, 446–449.
- Mimida, N., Saito, T., Moriguchi, T., Suzuki, A., Komori, S., and Wada, M. (2015). Expression of DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)-like genes in apple. *Biol. Plant.* 59, 237–244. doi: 10.1007/s10535-015-0503-4
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R. A., Fry, S. C., Krieger-Liszkay, A., and Leubner-Metzger, G. (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* 150, 1855–1865. doi: 10.1104/pp.109.139204
- Murcia, G., Pontin, M., Reinoso, H., Baraldi, R., Bertazza, G., Gómez-Talquenca, S., et al. (2015). ABA and GA₃ increase carbon allocation in different organs of grapevine plants by inducing accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, enhancement of phloem area and expression of sugar transporters. *Physiol. Plant* 156, 323–337. doi: 10.1111/ppl.12390
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541–585. doi: 10.1007/s00709-011-0329-7
- Nee, C.-C., and Fuchigami, L. H. (1992). Overcoming rest at different growth stages with hydrogen cyanamide. *Sci. Hortic.* 50, 107–113. doi: 10.1016/S0304-4238(05)80013-5

- Nicolas, W. J., Grison, M. S., Trépout, S., Gaston, A., Fouché, M., Cordelières, F. P., et al. (2017). Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nat. Plants* 3:17082. doi: 10.1038/nplants.2017.82
- Oncelay, C. Y., Daley, L. S., Vines, H. M., Couvillon, G. A., and Hendershott, C. H. (1979). Seasonal fluctuation in malate dehydrogenase, phosphatase and proteinase activity of dormant peach flower buds. *Sci. Hortic.* 11, 229–239. doi: 10.1016/0304-4238(79)90004-9
- Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D., et al. (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol. Biol.* 71, 403–423. doi: 10.1007/s11103-009-9531-9
- Or, E., Vilozy, I., Eyal, Y., and Ogrudovitch, A. (2000). The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Mol. Biol.* 43, 483–494. doi: 10.1023/A:1006450516982
- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J. M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., et al. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation: dormancy in sunflower seeds. *Plant J.* 50, 452–465. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03063.x
- Oracz, K., and Karpiński, S. (2016). Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Front. Plant Sci.* 7:864. doi: 10.3389/fpls.2016.00864
- Orffer, C. J., and Goussard, P. G. (1980). Effect of hot-water treatments on budburst and rooting of grapevine cuttings. *Vitis* 19, 1–3.
- Parada, F., Noriega, X., Dantas, D., Bressan-Smith, R., and Pérez, F. J. (2016). Differences in respiration between dormant and non-dormant buds suggest the involvement of ABA in the development of endodormancy in grapevines. *J. Plant Physiol.* 201, 71–78. doi: 10.1016/j.jplph.2016.07.007
- Park, J.-Y., Canam, T., Kang, K.-Y., Unda, F., and Mansfield, S. D. (2009). Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology. *Tree Physiol.* 29, 937–946. doi: 10.1093/treephys/tpp028
- Paul, L. K., Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2014). Shoot meristems of deciduous woody perennials: self-organization and morphogenetic transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 86–95. doi: 10.1016/j.pbi.2013.11.009
- Pérez, F. J., and Burgos, B. (2004). Alterations in the pattern of peroxidase isoenzymes and transient increases in its activity and in H₂O₂ levels take place during the dormancy cycle of grapevine buds: the effect of hydrogen cyanamide. *Plant Growth Regul.* 43, 213–220. doi: 10.1023/B:GROW.0000046003.33194.ac
- Pérez, F. J., and Lira, W. (2005). Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. *J. Plant Physiol.* 162, 301–308. doi: 10.1016/j.jplph.2004.07.011
- Pérez, F. J., Vergara, R., and Or, E. (2009). On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul.* 59, 145–152. doi: 10.1007/s10725-009-9397-5
- Pérez, F. J., Vergara, R., and Rubio, S. (2008). H₂O₂ is involved in the dormancy-breaking effect of hydrogen cyanamide in grapevine buds. *Plant Growth Regul.* 55, 149–155. doi: 10.1007/s10725-008-9269-4

- Pfeiffer, W., and Höftberger, M. (2001). Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells. *Physiol. Plant.* 111, 144–150. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110203.x
- Piola, F., Label, P., Vergne, P., Aderkas, P., and von Rohr, R. (1998). Effects of endogenous ABA levels and temperature on cedar (*Cedrus libani* Loudon) bud dormancy in vitro. *Plant Cell Rep.* 18, 279–283. doi: 10.1007/s002990050571
- Porto, D. D., Bruneau, M., Perini, P., Anzanello, R., Renou, J.-P., dos, et al. (2015). Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for FLC-like genes. *J. Exp. Bot.* 66, 2659–2672. doi: 10.1093/jxb/erv061
- Portrat, K., Mathieu, C., Motta, C., and Pétel, G. (1995). Changes in plasma membrane properties of peach tree buds and stands during dormancy. *J. Plant Physiol.* 147, 346–350. doi: 10.1016/S0176-1617(11)82165-6
- Pouget, R. (1965). Action de la chlorpromazine sur la dormance de la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Ann. Physiol. Vég.* 7, 273–282.
- Prassinis, C., Rigas, S., Kizis, D., Vlahou, A., and Hatzopoulos, P. (2011). Subtle proteome differences identified between post-dormant vegetative and floral peach buds. *J. Proteomics* 74, 607–619. doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.018
- Ramina, A., Colauzzi, M., Masia, A., Pitacco, A., Caruso, T., Messina, R., et al. (1995). Hormonal and climatological aspects of dormancy in peach buds. *Acta Hort.* 395, 35–46. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.395.3
- Regier, N., Streb, S., Zeeman, S. C., and Frey, B. (2010). Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* × *nigra* cv. Dorskamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. *Tree Physiol.* 30, 979–987. doi: 10.1093/treephys/tpq047
- Reinoso, H., Luna, V., Daurfa, C., Pharis, R., and Bottini, R. (2002). Dormancy in peach (*Prunus persica*) flower buds. VI. Effects of gibberellins and an acylcyclohexanedione (trinexapac-ethyl) on bud morphogenesis in field experiments with orchard trees and on cuttings. *Can. J. Bot.* 80, 664–674. doi: 10.1139/B02-051
- Rinne, P., Tuominen, H., and Junttila, O. (1994). Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Betula pubescens*. *Tree Physiol.* 14, 549–561. doi: 10.1093/treephys/14.6.549
- Rinne, P. L., Kaikuranta, P. M., and van der Schoot, C. (2001). The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J.* 26, 249–264. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2001.01022.x
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 125, 1477–1485.
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2003). Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense. *Can. J. Bot.* 81, 1182–1197. doi: 10.1139/b03-123
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2004). Cell-cell communication as a key factor in dormancy cycling. *J. Crop Improv.* 10, 113–156. doi: 10.1300/J411v10n01
- Rinne, P. L., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjärvi, J., et al. (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1, 3- β -glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell* 23, 130–146. doi: 10.1105/tpc.110.081307

- Rios, G., Conejero, A., Leida, C., Petri, C., Burgos, L., and Badenes, M. L. (2014). "Functional characterization of a SAP protein expressed in dormant buds of peach," in Proceedings of the 7th International Rosaceae Genomics Conference, Washington, DC, 20.
- Rodríguez, A., and Sánchez-Tamés, R. (1986). Dormancy and seasonal changes of plant growth regulators in hazel buds. *Physiol. Plant.* 66, 288–292. doi: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb02422.x
- Rodriguez, A. J., Sherman, W. B., Scorza, R., Wisniewski, M., and Okie, W. R. (1994). Evergreen' Peach, its inheritance and dormant behavior. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 789–792.
- Rodríguez-Gacio Mdel, C., Matilla-Vázquez, M. A., and Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal. Behav.* 4, 1035–1048. doi: 10.4161/psb.4.11.9902
- Rohde, A., Ruttink, T., Hostyn, V., Sterck, L., Van Driessche, K., and Boerjan, W. (2007). Gene expression during the induction, maintenance, and release of dormancy in apical buds of poplar. *J. Exp. Bot.* 58, 4047–4060. doi: 10.1093/jxb/erm261
- Rubio, S., Donoso, A., and Pérez, F. J. (2014). The dormancy-breaking stimuli "chilling, hypoxia and cyanamide exposure" up-regulate the expression of α -amylase genes in grapevine buds. *J. Plant Physiol.* 171, 373–381. doi: 10.1016/j.jplph.2013.11.009
- Rutschow, H. L., Baskin, T. I., and Kramer, E. M. (2011). Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. *Plant Physiol.* 155, 1817–1826. doi: 10.1104/pp.110.168.168187
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., et al. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19, 2370–2390. doi: 10.1105/tpc.107.052811
- Saito, T., Bai, S., Imai, T., Ito, A., Nakajima, I., and Moriguchi, T. (2015). Histone modification and signalling cascade of the dormancy-associated MADS-box gene, PpMADS13-1, in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) during endodormancy. *Plant Cell Environ.* 38, 1157–1166. doi: 10.1111/pce.12469
- Saito, T., Bai, S., Ito, A., Sakamoto, D., Saito, T., Ubi, B. E., et al. (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 Physiol.* 33, 654–667. doi: 10.1093/treephys/tpt037
- Sanchez-Perez, R., Del Cueto, J., Dicenta, F., and Martinez-Gomez, P. (2014). Recent advancements to study flowering time in almond and other *Prunus* species. *Front. Plant Sci.* 5:334. doi: 10.3389/fpls.2014.00334
- Sasaki, R., Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Kitamura, Y., Akagi, T., et al. (2011). Functional and expressional analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiol.* 157, 485–497. doi: 10.1104/pp.111.181982
- Saure, M. C. (1985). "Dormancy release in deciduous fruit trees," in *Horticultural Reviews*, ed. J. Janick (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.), 239–300. doi: 10.1002/9781118060735.ch6.
- Scalabrelli, G., Viti, R., and Cinelli, F. (1991). Change in the catalase activity and dormancy of apricot buds in response to chilling. *Acta Hortic.* 293, 267–274. doi: 10.17660/ActaHortic.1991.293.31

- Seif El-Yazal, M. A., Seif El-Yazal, S. A., and Rady, M. M. (2014). Exogenous dormancy-breaking substances positively change endogenous phytohormones and amino acids during dormancy release in 'Anna' apple trees. *Plant Growth Regul.* 72, 211–220. doi: 10.1007/s10725-013-9852-1
- Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Meitha, K., Foyer, C. H., and Considine, M. J. (2018). Roles for light, energy, and oxygen in the fate of quiescent axillary buds. *Plant Physiol.* 176, 1171–1181. doi: 10.1104/pp.17.01479
- Siller-Cepeda, J. H., Fuchigami, L. H., and Chen, T. H. (1992). Glutathione content in peach buds in relation to development and release of rest. *Plant Cell Physiol.* 33, 867–872.
- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A., and Scorza, R. (2012). Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar FT1 result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS One* 7:e40715. doi: 10.1371/journal.pone.0040715
- Stonebloom, S., Brunkard, A., Cheung, A. C., Jiang, K., and Zambryski, P. (2012). Redox states of plastids and mitochondria differentially regulate intercellular transport via plasmodesmata. *Plant Physiol.* 158, 190–199. doi: 10.1104/pp.111.186130
- Sudawan, B., Chang, C.-S., Chao, H. F., Ku, M. S. B., and Yen, Y. (2016). Hydrogen cyanamide breaks grapevine bud dormancy in the summer through transient activation of gene expression and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species. *BMC Plant Biol.* 16:202. doi: 10.1186/s12870-016-0889-y
- Tan, Y., Gao, D.-S., Li, L., Wei, H.-R., Wang, J.-W., and Liu, Q.-Z. (2015). Relationships between H₂O₂ metabolism and Ca²⁺ transport in dormancy-breaking process of nectarine floral buds. *Researchgate* 26, 425–429.
- Tarancón, C., González-Grandío, E., Oliveros, J. C., Nicolas, M., and Cubas, P. (2017). A conserved carbon starvation response underlies bud dormancy in woody and Herbaceous Species. *Front. Plant Sci.* 8:788. doi: 10.3389/fpls.2017.00788
- Tilsner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E. M. (2016). Staying tight: plasmodesmal membrane contact sites and the control of cell-to-cell connectivity in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 337–364. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015
- Tuan, P. A., Bai, S., Saito, T., Ito, A., and Moriguchi, T. (2017). Dormancy-Associated MADS-Box (DAM) and the abscisic acid pathway regulate pear endodormancy through a feedback mechanism. *Plant Cell Physiol.* 58, 1378–1390. doi: 10.1093/pcp/pcx074
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. doi: 10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x
- Ubi, B. E., Sakamoto, D., Ban, Y., Shimada, T., Ito, A., Nakajima, I., et al. (2010). Molecular cloning of dormancy-associated mads-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese pear. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 174–182.
- Uemura, M., and Steponkus, P. L. (1999). Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J. Plant Res.* 112, 245–254. doi: 10.1007/PL00013882
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., et al. (2009). Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2, 1310–1324. doi: 10.1093/mp/ssp053

- van der Schoot, C., Paul, L. K., Paul, S. B., and Rinne, P. L. (2011). Plant lipid bodies and cell-cell signaling. *Plant Signal. Behav.* 6, 1732–1738. doi: 10.4161/psb.6.11.17639
- Vergara, R., Rubio, S., and Pérez, F. J. (2012). Hypoxia and hydrogen cyanamide induce bud-break and up-regulate hypoxic responsive genes (HRG) and VvFT in grapevine-buds. *Plant Mol. Biol.* 79, 171–178. doi: 10.1007/s11103-012-9904-3
- Viti, R., Bartolini, S., and Zanol, G. C. (2012). Biological changes and active oxygen-scavenging enzymes activities in apricot (*Prunus armeniaca* L.) flower buds during dormancy transitions. *Acta Hortic.* 940, 331–339. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.940.47
- Wang, D., Gao, Z., Du, P., Xiao, W., Tan, Q., Chen, X., et al. (2016). Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Crop Sci. Hortic.* 6:1248. doi: 10.3389/fpls.2015.01248
- Wang, M., van der Meulen, R. M., Visser, K., Van Schaik, H. P., Van Duijn, B., and de Boer, A. H. (1998). Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Sci. Res.* 8, 129–137. doi: 10.1017/S0960258500004025
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1988). Changes of fatty acids and sterols in apple buds during bud break induced by a plant bioregulator, thidiazuron. *Physiol. Plant.* 72, 115–120. doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb06631.x
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1990). Changes of membrane lipids in apple buds during dormancy and budbreak. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115, 803–808.
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1994). Changes in polyamine content during dormancy in flower buds of 'Anna'. *Apple. J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 70–73.
- Wang, S. Y., Ji, Z. L., Sun, T., and Faust, M. (1987). Effect of thidiazuron on abscisic acid content in apple bud relative to dormancy. *Physiol. Plant.* 71, 105–109. doi: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04625.x
- Wen, L. H., Zhong, W. J., Huo, X. M., Zhuang, W. B., Ni, Z. J., and Gao, Z. H. (2016). Expression analysis of ABA- and GA-related genes during four stages of bud dormancy in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 91, 362–369. doi: 10.1080/14620316.2016.1160546
- Wisniewski, M., and Ashworth, E. N. (1986). A comparison of seasonal ultrastructural changes in stem tissues of peach (*Prunus persica*) that exhibit contrasting mechanisms of cold hardiness. *Bot. Gaz.* 147, 407–417. doi: 10.1086/337608
- Wisniewski, M., Norelli, J., and Artlip, T. (2015).). Overexpression of a peach CBF gene in apple: a model for understanding the integration of growth, dormancy, and cold hardiness in woody plants. *Front. Plant Sci.* 6:85. doi: 10.3389/fpls.2015.00085
- Wu, R., Wang, T., Warren, B. A. W., Allan, A. C., Macknight, R. C., and Varkonyi-Gasic, E. (2017). Kiwifruit SVP2 gene prevents premature budbreak during dormancy. *J. Exp. Bot.* 68, 1071–1082. doi: 10.1093/jxb/erx014
- Xu, H., Cao, D., Chen, Y., Wei, D., Wang, Y., Stevenson, R. A., et al. (2016). Gene expression and proteomic analysis of shoot apical meristem transition from dormancy to activation in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Sci. Rep.* 6:19938. doi: 10.1038/srep19938
- Yamane, H., Kashiwa, Y., Ooka, T., Tao, R., and 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. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133, 708–716.
- Yooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Cha-um, S., et al. (2012). Hydrogen cyanamide enhances MRI-measured water status in flower buds of peach (*Prunus persica* L.) during winter. *Plant Omics* 5, 400–404.
- Yooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Yamaguchi, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., et al. (2008). Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiol. Plant.* 134, 522–533. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01143.x
- Yooyongwech, S., Sugaya, S., Sekozawa, Y., and Gemma, H. (2009). Differential adaptation of high- and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content. *Plant Cell Rep.* 28, 1709–1715. doi: 10.1007/s00299-009-0770-7
- Zanol, G. C., Sekozawa, Y., Sugaya, S., and Gemma, H. (2010). The glutathione accumulation on mixed bud tissues during the dormancy of Japanese pear. *Acta Hortic.* 872, 77–84. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.872.7
- Zhang, Y., Sun, T., Liu, S., Dong, L., Liu, C., Song, W., et al. (2016). MYC cis-Elements in PsMPT promoter is involved in chilling response of *Paeonia suffruticosa*. *PLoS One* 11:e0155780. doi: 10.1371/journal.pone.0155780
- Zhang, Y. X., Yu, D., Tian, X. L., Liu, C. Y., Gai, S. P., and Zheng, G. S. (2015). Differential expression proteins associated with bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Biol.* 17, 114–122. doi: 10.1111/plb.12213
- Zheng, C., Halaly, T., Acheampong, A. K., Takebayashi, Y., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., et al. (2015). Absciscic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *J. Exp. Bot.* 66, 1527–1542. doi: 10.1093/jxb/eru519
- Zhong, W., Gao, Z., Zhuang, W., Shi, T., Zhang, Z., and Ni, Z. (2013). Genome-wide expression profiles of seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot. *Plant Mol. Biol.* 83, 247–264. doi: 10.1007/s11103-013-0086-4
- Zhuang, W., Gao, Z., Wang, L., Zhong, W., Ni, Z., and Zhang, Z. (2013). Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA4 in Japanese apricot flower bud dormancy release. *J. Exp. Bot.* 64, 4953–4966. doi: 10.1093/jxb/ert284
- Zhuang, W., Gao, Z., Wen, L., Huo, X., Cai, B., and Zhang, Z. (2015). Metabolic changes upon flower bud break in Japanese apricot are enhanced by exogenous GA4. *Hortic. Res.* 2:15046. doi: 10.1038/hortres.2015.46
- Zhuang, W., Gao, Z., Wen, L., Huo, X., Cai, B., and Zhang, Z. (2015b). Metabolic changes upon flower bud break in Japanese apricot are enhanced by exogenous GA4. *Hortic. Res.* 2, 15046. doi:10.1038/hortres.2015.46.

I. Présentation de la thèse

Enjeux scientifiques et socio-économiques

Les reconstitutions et prédictions climatiques convergent pour confirmer l'accélération du réchauffement climatique. Une augmentation entre 2 et 4°C est prévue à l'horizon 2050 (rapport du Groupe experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat, 2007). Dans ce contexte, de nombreuses questions ayant trait à l'adaptation des espèces fruitières au changement climatique se posent.

Afin de sauvegarder la production des espèces fruitières en France, les programmes classiques de sélection doivent désormais incorporer à leurs critères de sélection des caractères liés à l'adaptation au changement climatique. La cinétique de floraison étant déterminée par des besoins en froid pour lever la dormance puis par des besoins en chaleur pour assurer l'épanouissement des fleurs, il apparaît essentiel de disposer de nouvelles variétés présentant de nouveaux équilibres entre ces besoins : faibles besoins en froid pour faire face à des hivers plus doux mais associés à de forts besoins en chaleur pour ne pas trop avancer la floraison.

Ainsi, l'enjeu scientifique de la thèse est de développer une approche intégrative pour étudier les mécanismes physiologiques et moléculaires de la dormance des bourgeons chez le cerisier doux. Ce modèle d'étude se justifie pleinement en raison de sa forte réponse aux températures douces pendant les périodes hivernales, entraînant des désordres liés à la « non satisfaction » des besoins en froid déjà visible.

A long terme, les résultats de cette thèse devraient conduire à la création de modèles qui permettront le choix de géniteurs et la création de variétés adaptées à des températures plus élevées et produisant des fruits de qualité. Ceci est tout particulièrement pertinent chez le cerisier, espèce pérenne présentant une longue période juvénile et dont le processus de création variétale est d'une trentaine d'années. Il est donc indispensable, d'intégrer ces nouveaux critères dès à présent dans les programmes d'amélioration pour anticiper les besoins de la profession. De plus il faut noter que les vergers sont implantés pour une vingtaine d'années et donc le choix des variétés est primordial pour les producteurs. Dans ce contexte, l'enjeu économique et sociétal est de savoir si dans les régions traditionnelles de culture du cerisier, la production pourra se maintenir dans le futur.

Objectifs et hypothèses de travail

La thèse a pour principal objectif de mieux comprendre, chez le cerisier, les mécanismes physiologiques et moléculaires sous-jacents au passage de l'endodormance à l'écodormance, appelée « levée de dormance ».

Pour aboutir à cet objectif, une étude intégrative associant différentes approches a été choisie. Nous nous sommes basés sur les données bibliographiques pour tester une première hypothèse selon laquelle l'état de dormance des bourgeons pouvait être caractérisé par leur composition en métabolites. Par ailleurs, une autre hypothèse que nous avons voulu tester concerne l'implication des hormones et des stress oxydatifs qui seraient associés à la dormance des bourgeons. Pour étudier cette hypothèse, nous avons fait le choix de tester un ensemble de substances exogènes, incluant des hormones et des molécules entraînant ce type de stress. De plus pour vérifier l'effet de l'accumulation de froid sur la levée de dormance des essais ont été réalisés en appliquant différentes modalités de traitements de forçage. Enfin, des analyses d'expression de gènes par des techniques de RNAseq ont été entreprises pour tester l'hypothèse d'un contrôle génétique ou épigénétique de la dormance, déjà mis en évidence chez un ensemble d'espèces pérennes.

L'objectif appliqué de la thèse est d'identifier des marqueurs biochimiques pour caractériser l'état de dormance. Ceci est tout particulièrement important compte-tenu de la lourdeur de tous les tests classiques utilisés pour évaluer la date de levée de dormance. Ces tests sont consommateurs en temps, très gourmands en matériel végétal et nécessitent des installations expérimentales dédiées, telles que des chambres climatiques. Un dosage de composés biochimiques, moins couteux, et réalisable à grande échelle serait ainsi une révolution dans l'évaluation de la dormance en arboriculture fruitière.

On peut espérer des résultats significatifs compte-tenu de la variabilité génétique importante pour ce caractère de besoins en froid au sein des collections de ressources génétiques disponibles chez le cerisier. Ainsi, à terme, il sera possible en se basant sur des modèles prédictifs associant des données de génétiques, de physiologie et des données climatiques d'identifier des géniteurs pour créer de nouvelles variétés adaptées aux conditions climatiques futures.

Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

I.1. Dispositif expérimental

Dans cette étude, le matériel végétal utilisé est constitué d'arbres adultes de cerisier doux (*Prunus avium* L.). Ils ont été greffés soit sur porte-greffe Colt dans la pépinière du domaine de la Tour de Rance à Bourran (44° 19' 56" N, 0° 24' 47" E), soit sur porte-greffe Sainte Lucie dans la pépinière du domaine des Jarres à Toulence (48° 51' 46" N, 2° 17' 15" E). Ces deux domaines appartiennent à l'Unité Expérimentale Arboricole (UEA) de l'INRA et sont situés en Nouvelle-Aquitaine. Dans les vergers, chaque accession est représentée par deux arbres juxtaposés. Les arbres sont plantés à une distance de 5 mètres sur le rang, chaque rang est distant de 6 mètres.

Le domaine de la Tour de Rance est situé sur les premières terrasses du Lot, les terres sont de type « boulbène » (1/3 limons ; 1/3 argiles ; 1/3 sables), les sols sont battants et asséchants en été, nécessitant une gestion fine de l'irrigation. Il s'agit des sols typiques de la région de production des fruits dans le Lot et Garonne. Le climat est à la fois de type océanique mais l'influence continentale est réelle, avec en particulier des étés plus secs et des hivers plus froids qu'en climat océanique typique, avec une pluviométrie annuelle d'environ 700 mm. Le domaine des Jarres, est localisé près de Toulence en Gironde (40 mn de l'INRA du Centre de l'INRA de Bordeaux). Les terres sont des alluvions fertiles profondes, non battantes, non sensibles à l'asphyxie racinaire et à la sécheresse. Le climat y est océanique, avec 850 mm de précipitation par an, et peu de risque de gelées. Les deux domaines, sont certes situés dans la même région géographique, néanmoins ils offrent des conditions pédoclimatiques très différentes. Dans les deux domaines, un amendement raisonné est apporté, la taille des arbres se limite à un nettoyage inter-rang non manuel. Les vergers sont équipés de capteurs thermiques qui enregistrent la température toutes les heures. Dans le domaine de Bourran les parcelles sont irriguées en micro aspersion, l'eau d'irrigation provenant du Lot. En revanche, à Toulence, de par les caractéristiques du sol l'irrigation est apportée par aspersion en fonction des besoins.

I.2. Variétés étudiées

Dans un premier temps, 54 variétés ont été étudiées, il s'agit d'une core collection représentant la gamme de précocité de floraison des collections de cerisier disponibles à l'INRA (Annexe 2). Ultérieurement, sept variétés de cerisier et un clone de merisier ont été retenus pour des études approfondies : 'Bigarreau Hatif Burlat', 'Cristobalina', 'Duroi 3', 'Garnet®', 'Lapins', merisier Pontaris®, 'Regina' et 'Saint Georges', ces accessions présentent des caractéristiques contrastées pour le caractère étudié dans le cadre de cette thèse, la dormance des bourgeons. D'autres critères ont également été pris en compte, notamment l'origine des variétés, le groupe de diversité auquel elles appartiennent (Campoy et al., 2016), leur type (variété traditionnelle ou moderne), leur précocité de floraison et de maturité, leur utilisation en cartographie génétique et détection de QTL (Tableau 7). 'Cristobalina', est une variété espagnole qui requiert de très faibles besoins en froid, 'Saint-Georges' a été sélectionnée car elle semble présenter des besoins en froid similaires à ceux de 'Cristobalina', mais ne possède pas le même fond génétique. 'Bigarreau Hatif Burlat'² est une variété très ancienne qui est une référence aussi bien en France que dans le monde, elle se caractérise par des besoins en froid intermédiaires mais une période floraison-maturité particulièrement courte. La variété 'Garnet®' est une variété américaine aux besoins en froid intermédiaires et montrant une floraison précoce, 'Lapins' est une variété canadienne présentant une précocité de floraison similaire à celle de 'Garnet®' mais ne possédant pas le même fond génétique. La variété 'Duroi 3' est une variété italienne qui requiert des besoins en froids très élevés. Enfin, 'Regina' est une variété allemande qui a des besoins en froid élevés et est très productive. Ces trois dernières variétés sont les parents de croisements, dont les descendances ont été utilisées pour élaborer des cartes génétique (qui ont permis la détection de QTL pour un ensemble de caractères d'intérêt, en particulier les besoins en froid, les besoins en chaud et la date de floraison (Castède, 2014 ; Castède et al., 2014)). Le clone de merisier 'Pontaris®' qui présente une date de floraison intermédiaire, a été inclus dans cette étude pour disposer au moins d'un représentant du compartiment sauvage de l'espèce. Par ailleurs, pour les tests de produits pouvant avoir un effet sur la levée de dormance qui requièrent beaucoup de rameaux, nous avons choisi la variété 'Fertard'. Cette variété est tardive, ces tests ont pu donc être facilement intégrés dans le timing des études devant être réalisées au printemps. En outre, 'Fertard' est disponible en de nombreuses copies dans les vergers, ce qui permettait de disposer de suffisamment de rameaux (tests destructeurs). Les variétés étudiées appartiennent soit à la Collection nationale soit à la Collection INRA de

² Pour simplifier 'Bigarreau Hâtif Burlat' sera dorénavant désigné 'Burlat'.

cerisier, ces collections sont conservées au sein du Centre de Ressources Biologiques (CRB) *Prunus* géré par l'UEA.

Tableau 7 : Caractéristiques des variétés étudiées

Nom de la Variété		Bigarreau Hatif Burlat	Cristobalina	Duroni 3	Fertard	Garnet®	Lapins	Regina	Saint Georges	Pontaris®
N° de Code		V0370	V0897	V2472	V3382	V2155	V2180	V2868	V3856	V1766
Provenance		France	Espagne	Italie	France	USA	Canada	Germany	France	France
Status		Sélection ancienne	Variété traditionnelle	Variété moderne	Variété moderne	Variété moderne	Variété moderne	Variété moderne	Variété traditionnelle	Clone de merisier sélectionné comme porte- greffe
Type de Collection dans le CRG <i>Prunus</i>		Témoin de la Collection nationale Cerisier	Collection INRA Cerisier	Collection INRA Cerisier	Collection INRA Cerisier	Collection INRA Cerisier	Collection INRA Cerisier	Collection INRA Cerisier	Collection Nationale Cerisier	Collection INRA Cerisier
Pedigree	Parent 1	Inconnu	Inconnu	Inconnu	'Sunburst' (=Van'x 'Stella')	'Hardy Giant'	'Van'	'Schneiders Späte Knorpelkirsche'	Inconnu	Inconnu
	Parent 2	Inconnu	Inconnu	Inconnu	Inconnu	'Bing'	'Stella'	'Rube'	Inconnu	Inconnu
Floraison		Intermédiaire	Très précoce	Très tardive	Très tardive	Précoce	Intermédiaire	Tardive	Très précoce	Intermédiaire
Maturité		Précoce	Précoce	Tardive	Tardive	Intermédiaire	Intermédiaire	Tardive	Précoce	-
Groupe de diversité (Campoy <i>et al.</i> , 2016)		3	7	3	4	4	4	2	7	-
Cartographie Génétique et détection de QTL		-	-	-	-	Castède <i>et al.</i> , 2014	Castède <i>et al.</i> , 2014	Castède <i>et al.</i> , 2014	-	-

II. Evaluation de la date de levée de dormance et des besoins en froid

Les études ont été réalisées durant deux périodes hivernales : 2011-2012 et 2015-2016. Une étude préliminaire a été réalisée avec des échantillons des variétés 'Cristobalina', 'Garnet®' 'Lapins' et 'Regina' prélevés pendant la première période et disponibles au laboratoire. Puis les six variétés 'Burlat', 'Cristobalina', 'Duroni 3', 'Garnet®' 'Regina' et 'Saint Georges' et le clone de merisier Pontaris® ont été évalués pendant la deuxième période.

Pour l'étude de la levée de dormance et le calcul de besoins en froid, de 2 à 4 rameaux sont prélevés pour chaque variété sur les deux arbres disponibles dans les collections, de manière aléatoire, une fois par mois de juillet à septembre puis deux fois par mois d'octobre à la floraison. Ces rameaux doivent comprendre une trentaine de bourgeons floraux pour les observations phénologiques. Pour les études biochimiques, trois rameaux sont prélevés par individu au même moment que ceux pour les observations phénologiques. Les bourgeons floraux sont pris aléatoirement sur les bouquets de mai et placés dans un tube cryogénique de contenance 2ml, ce qui représente une quantité approximative de 1g (environ 50 bourgeons avant tout débourrement). Les tubes sont immédiatement plongés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Les prélèvements de rameaux sont effectués depuis l'été jusqu'à la floraison et permettent de définir les besoins en froid et en chaud ainsi que la date de levée de l'endodormance.

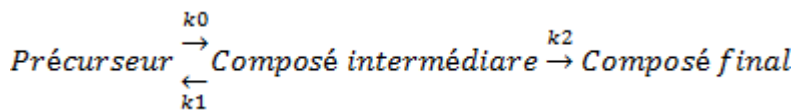
Date de levée de dormance

Les rameaux prélevés sont mis en forçage dans des seaux contenant de l'eau du robinet dans une chambre de forçage à température constante de 25°C, avec une hygrométrie comprise entre 60 et 80%, avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. L'eau est changée régulièrement pour éviter le développement de champignons. Après 10 jours de forçage, le nombre total de bourgeons floraux par rameau est noté, et ceux ayant atteint le stade BBCH 55 (ou « stade C ») sont comptés (Meier 1994) (Annexe 3). Le pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade BBCH55 est calculé par chaque date de prélèvement par rameau et par variété.

Besoins en froid

Le calcul des portions de froid par le modèle empirique dynamique (Fishman et al., 1987) est complexe. Ce modèle repose sur l'hypothèse que l'accumulation d'une certaine quantité de froid se fait en 2 étapes, la première étape fournissant un composé intermédiaire qui pourra être annulé si les températures sont trop chaudes, ou au contraire s'accumuler de manière irréversible dans le bourgeon si les températures sont suffisamment basses.

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 :



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 :

$$x_i = \frac{e^{slp \cdot tetmlt \cdot ((T_K - tetmlt)/T_K)}}{1 + e^{slp \cdot tetmlt \cdot ((T_K - tetmlt)/T_K)}}$$

$$x_s = \frac{a_0}{a_1} \cdot e^{(s_1 - s_0)/T_K}$$

$$ak_1 = a_1 \cdot e^{-(s_1/T_K)}$$

$$inter_E = x_s - (x_s - inter_S) \cdot e^{-ak_1}$$

$$inter_S = \begin{cases} t = t_0 & : 0 \\ t > t_0 \wedge inter_{E_{t-1}} < 1 & : inter_{E_{t-1}} \\ t > t_0 \wedge inter_{E_{t-1}} \geq 1 & : inter_{E_{t-1}} \cdot (1 - x_i) \end{cases}$$

$$delt = \begin{cases} t = t_0 & : 0 \\ t > t_0 \wedge inter_{E_{t-1}} < 1 & : 0 \\ t > t_0 \wedge inter_{E_{t-1}} \geq 1 & : x_i \cdot inter_{E_{t-1}} \end{cases}$$

$$CP_t = \begin{cases} t = t_0 & : delt \\ t \geq t_0 & : delt + CP_{t-1} \end{cases}$$

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 ($T_K = T_C + 273$) ; t exprime le temps en heure et t_0 marque le début de l'accumulation de froid.

III. Analyses biochimiques

Deux types d'analyses biochimiques ont été réalisés : des analyses non ciblées par RMN du proton et des analyses ciblées par dosages enzymatiques. Ces analyses ont été effectuées à la Plateforme Métabolome de Bordeaux (<http://www.bordeaux.inra.fr/pmb/>). Par ailleurs, le dosage du glutathion, molécule clé du potentiel redox du cytoplasme de la cellule, ainsi que pour la détoxification des ROS a été réalisé au sein de la société Roullier, Saint Malo, France (<http://www.roullier.com/fr/>) selon un protocole confidentiel. De plus, le dosage des hormones (ABA) a été effectué à la Plateforme Metatoul de Toulouse selon le mode opératoire modifié de (Götz et al., 2014) indiqué en Annexe 4. Les deux protocoles proposés dans le mode opératoire ont été testés mais seul le protocole B a été retenu pour l'ensemble des analyses.

III.1 Analyses spectroscopiques par RMN du proton de molécules organiques

Les métabolites polaires ont été extraits à partir de 50 mg de poudre lyophilisée par trois extractions éthanol-eau successives à 80°C (adapté de (Moing et al., 2004)) pendant 15 min avec tout d'abord 2 ml d'éthanol/eau à 80/20 (v/v), puis 2 ml d'éthanol/eau à 50/50 (v/v) et enfin 3 ml d'eau MilliQ. A chaque étape les surnageants sont récupérés après une centrifugation de 10 min à $30\,000\text{ g}$, puis rassemblés et séchés durant une nuit dans un concentrateur centrifuge sous vide (SpeedVac, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) puis solubilisés dans 500 μl d'une solution tampon deutéré de phosphate de potassium 200 mM pH 6,0, contenant 2 mM de sel disodique d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), pour chélater les cations paramagnétiques, et de triméthylsilyl [2,2,3,3-d4] propionate de sodium

(TSP, concentration finale 0,01% mg/ml) pour l'étalonnage du déplacement chimique. Les extraits ont ensuite été ajustés avec une solution de deutéroxyde de potassium (KOD) à un pH apparent de 6,0 à l'aide d'un robot titreur BTpH (Bruker, Karlsruhe, Germany) puis lyophilisés et stockés à l'obscurité, sous vide et à température ambiante, en attendant l'analyse par ^1H -RMN.

Pour l'analyse RMN- ^1H , 500 μl de D_2O ont été ajoutés à chaque extrait titré lyophilisé. Le mélange a été centrifugé à 17 700 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant a ensuite été transféré dans un tube RMN de 5 mm pour l'acquisition. Les spectres ^1H -RMN ont été enregistrés à 500.162 MHz et 300 K sur un spectromètre Avance III (Bruker Biospin, Wissembourg, France) en utilisant une sonde inverse large bande ATMA de 5 mm et un angle d'impulsion de 90° . Les annotations des métabolites dans les spectres RMN ont été faites en comparant les déplacements chimiques des protons avec les valeurs de la littérature ou de bases de données (MeRy-B, (Ferry-Dumazet et al., 2011), HMDB, (Wishart et al., 2013), BMRB, (Ulrich et al., 2008) et par comparaison avec les spectres de composés authentiques. Afin d'approfondir l'étude structurale de certains métabolites inconnus ou incertains, des expériences de RMN bidimensionnelles ont été réalisées : COSY ^1H - ^1H (homonuclear COrrrelation SpectroscopY) et HSQC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single-Quantum Correlation).

III.2. Analyses biochimiques ciblées par dosages enzymatiques

III.2.1. Préparation du matériel

Les bourgeons maintenus congelés, sont broyés automatiquement avec un broyeur à bille dans une cryostation. Pour le broyage, 2 billes sont déposées dans chaque tube puis les tubes sont soumis à des secousses de 1750Hz pendant 45 secondes, et si besoin, pendant 1mn30. Après broyage, 20 mg de poudre de chaque échantillon sont pesés et placés dans des tubes microniques qui eux-mêmes placés dans des racks de 96 échantillons. Deux réplicats techniques sont réalisés par échantillons. De plus, des tubes contenant une quantité approximativement identique de chaque échantillon sont utilisés pour créer un échantillon de référence. Ces tubes microniques de référence sont ensuite utilisés pour la calibration des analyses métaboliques. Les tubes sont disposés aléatoirement sur les racks et sur un rack aléatoire afin de randomiser au mieux les échantillons. Un minimum de 5 échantillons de référence ainsi que 5 tubes vides qui seront les témoins « blancs » sont positionnés sur chaque rack.

III.2.2. Extraction des métabolites

Les métabolites totaux sont extraits en 3 étapes à l'aide de protocoles robotisés. Les échantillons sont conservés quelques minutes au congélateur à -20°C afin de permettre l'enlèvement des bouchons plus rapidement et ainsi éviter tout risque de décongélation des échantillons. Ensuite, sont ajoutés 250 μl d'un mélange d'éthanol 80% v/v, Hepes/KOH 10mM pH6, puis les échantillons sont bien homogénéisés et chauffés à 80°C pendant 20 mn au bain marie. Après refroidissement sur de la glace, les échantillons sont centrifugés à 14000 tours par mn (rpm) pendant 5 mn et le surnageant est collecté dans un nouveau tube. Le culot est additionné de 150 μl du même mélange que précédemment et les étapes sont répétées. Le surnageant est ajouté au surnageant précédent. Enfin, le culot est additionné de 250 μl d'un mix d'éthanol 50% v/v, Hepes/KOH 10 mM pH6 et les mêmes étapes sont répétées. Le surnageant de cette étape est ajouté au surnageant des étapes précédentes. A la fin de cette étape on obtient un volume double de celui initial, contenant donc avec le double d'échantillons de départ : 650 μl d'extrait éthanolique et un culot. Les blancs sont donc composés d'un mélange d'éthanol 70% v/v, Hepes/KOH 10 mM pH6, qui correspond au mélange dans lequel se trouvent les métabolites du surnageant. Toutes les étapes de pipetage sont effectuées par des robots, ainsi les erreurs suivent une loi normale. Le surnageant contient les sucres solubles, les acides aminés, et les acides organiques majeurs, alors que le culot contient pour sa part l'amidon et les protéines. A noter qu'une dizaine d'échantillons référents a été pesée en sus, et extraite au même moment. Ces derniers permettent d'effectuer les mises au point et optimisations pour les dosages de métabolites.

III.2.3. Dosage des métabolites

Le principe du dosage de métabolites consiste à effectuer une réaction chimique qui produit ou consomme un élément qui absorbe certaines longueurs d'onde. L'évolution de la densité optique (DO) à cette longueur d'onde renseigne sur la quantité du métabolite de base de manière indirecte. La réaction chimique, enzymatique, nécessite des conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme. Des mises au point ont été réalisées avec ou sans polyvinylpyrrolidone (PVP) et Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et de dilution, pour enlever l'effet éventuel de polyphénols ou autres molécules. L'évolution de la DO est une fonction affine de la quantité de produit de base dans une certaine gamme de valeurs (zone de linéarité). C'est tout l'intérêt des essais de concentration et de volume à ajouter pour la réaction. Les échantillons de référence vont permettre de définir plusieurs paramètres pour les dosages futurs : volume optimal à utiliser pour les dosages, dilution optimale, ajout de PVP et/ou de PVPP. Ces échantillons de référence permettent en plus de connaître la quantité

moyenne de métabolites que l'on doit retrouver dans les référents de la plaque et donc de calibrer ou corriger les valeurs d'une plaque.

Dosage des hexoses

Le glucose, fructose et saccharose sont dosés successivement selon trois réactions distinctes. En premier lieu, le glucose-6-phosphate (G6P) contenu dans le milieu de réaction est consommé pour donner du NADPH. Ensuite, afin de doser le glucose, l'hexokinase (HK) est ajoutée au milieu, qui sera transformé en NADPH. Ainsi, la différence de DO après ajout de l'enzyme et avant ajout de l'enzyme représente la quantité de glucose présente dans le mélange, ainsi un ΔOD_{340} est calculé. L'hexokinase permet aussi de transformer le fructose en fructose-6-phosphate (F6P). Ensuite, la phosphoglucosomérase (PGI) est ajoutée au milieu afin de transformer le F6P en G6P et transformée en NADPH. Enfin, avec le même principe le saccharose est clivé par l'invertase et les enzymes précédentes produisent à leur tour du NADPH.

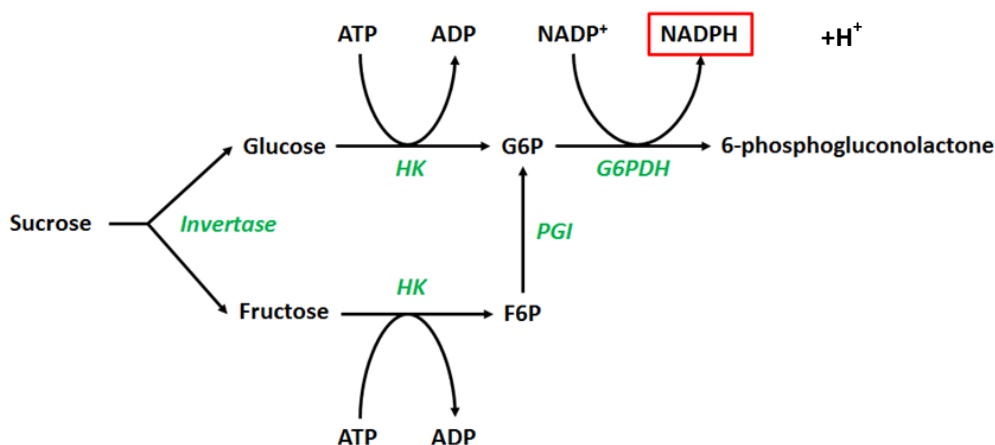


Figure 17 : Réactions biochimiques illustrant le principe du dosage des hexoses

Les réactions sont réalisées dans les conditions suivantes : 10 μ L d'extrait éthanolique dilués au $1/10^{\text{ème}}$ sont dilués avec un mélange contenant un tampon 0.1M Hepes/KOH pH 7.0 avec 3mM $MgCl_2$, 1.5mg/ml ATP, 1mg/ml $NADP^+$ et 1 μ L G6PDH grade II (180 μ L final) à 1u/ μ L. Après mesure d'un 'blanc' à 340nm, 1 μ L d'hexokinase (HK) à 1u/ μ L est ajouté au mélange pour doser le glucose, puis 1 μ L de phosphoglucosomérase (PGI) à 1u/ μ L est ajouté pour mesurer le fructose, et enfin, 1 μ L d'invertase (INV) à 1u/ μ L pour la mesure du contenu en saccharose. La quantité de NADPH est calculée suivant la formule :

$$NADPH (\mu mol) = \frac{\Delta OD_{340}}{l' \times \epsilon}$$

Avec ϵ , le coefficient absorption du NADPH à 340nm, $\epsilon = 6.22 \mu M^{-1}.cm^{-1}$, et l' , la largeur du puit, $l' = 2.85 cm.L^{-1}$.

Dosage du sorbitol

Le sorbitol est dosé lors d'une simple réaction. Le sorbitol est dégradé après ajout de l'enzyme sorbitol déshydrogénase pour produire du fructose puis du 6-phosphogluconolactone. Lors de la réaction, l'enzyme conduit à la réduction de NAD^+ en NADH , et l'on enregistre la ΔOD_{340} avant et après ajout de l'enzyme. La quantité de NADH est donnée par l'équation suivante :

$$\text{NADH } (\mu\text{mol}) = \frac{\Delta\text{OD}_{340}}{l' \times \varepsilon}$$

Avec ε , le coefficient absorption du NADH à 340nm, $\varepsilon = 6.22 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, et l' , la largeur du puits, $l' = 2.85 \text{ cm.l}^{-1}$.

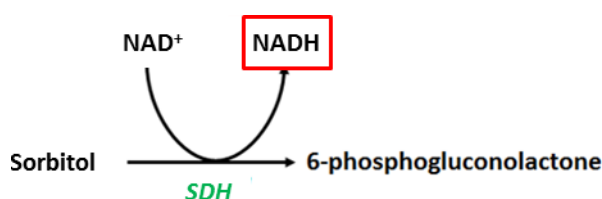


Figure 18 : Principe du dosage du sorbitol

Dosage du malate

Le dosage du malate est effectué par une réaction avec la malate déshydrogénase. Le principe est d'effectuer une réaction d'oxydoréduction lors de laquelle un colorant jaune, le sel de tétrazolium (le MTT) sous la forme oxydé est réduit et arbore une couleur pourpre à l'état réduit, absorbant à 570nm. Le PMS est un accepteur intermédiaire d'électron lors de l'oxydation du NADH en NAD^+ , dont aura besoin la malate déshydrogénase lors de la transformation du malate en oxaloacétate.

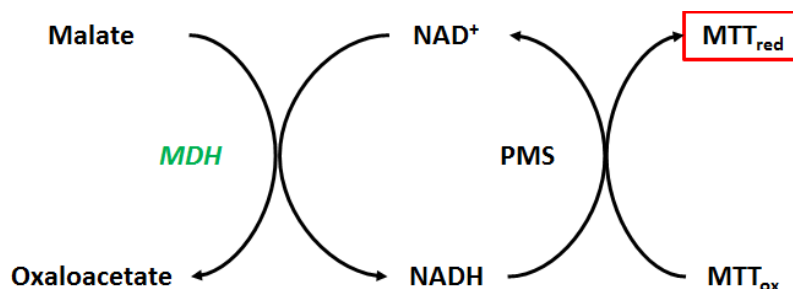


Figure 19 : Principe du dosage de l'acide malique

Dosage de l'amidon

L'amidon est mesuré à partir du culot dilué issu de l'extraction éthanolique qui suit le dosage des protéines. Tout d'abord, l'amidon doit être hydrolysé en fractions de glucose. Pour cela, 5 µl de HCl 0,5 M, acétate / NaOH 0,1 M ajusté à pH 4,9 sont ajoutés à 40 µl de culot dilué. Ensuite, un mélange de dégradation d'amidon, contenant 1 u / ml d'amyloglucosidase et 1 u / ml d'α-amylase dans du tampon acétate 50 mM, est ajouté à un volume final de 100 µl. Les extraits sont ensuite incubés à 37 ° C pendant 10 à 16 heures. L'amidon, en tant que fragments de glucose, peut ensuite être mesuré en utilisant le test dosage du glucose.

IV. Tests de produits pouvant accélérer la levée de dormance

Des produits pouvant avoir un effet sur la levée de dormance ont été testés : hormones (acide abscissique (ABA) et acides gibbérelliques (GA₃, GA₄), Paclobutrazol (antagoniste de la synthèse des gibbérellines), Fluridone (inhibiteur de la synthèse d'ABA), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et pyruvate de sodium (effet protecteur au H₂O₂). Ces produits sont testés en conditions confinées car ils ne sont pas homologués pour être utilisés en verger. Les produits ont été apportés de manière exogène soit sous forme de pulvérisation soit en solution, les rameaux étant placés immédiatement en chambre de culture à 25°C (test de forçage) pour étudier l'effet des produits sur le débourrement des bourgeons floraux. Par ailleurs, pour avoir une information sur l'effet éventuel des produits sur la levée de dormance, d'autres lots de rameaux sont traités avec la molécule d'intérêt puis laissés en conditions naturelles. Puis, ces lots sont placés en conditions de forçage à différents intervalles de temps (14 jours et/ou 35 jours). Cette procédure a été choisie afin de s'approcher un maximum des conditions dans lesquelles se trouvent les arbres au verger. Ensuite, comme pour un test de levée de dormance, le pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C est calculé.

Les tests ont été réalisés pendant deux périodes hivernales (2015-2016 et 2016-2017). Ils ont été effectués sur la variété 'Fertard'.

Les molécules sont appliquées de deux manières différentes : soit en apport ponctuel *via* pulvérisation, mélangées avec un surfactant permettant leur pénétration dans les bourgeons. Ce surfactant ('Calanque'®, Action Pin, Castets, France) est un agent utilisé traditionnellement dans les produits phytosanitaires. Ce surfactant est utilisé à une concentration finale de 1%. Dans ce cas, les rameaux sont plongés dans cette solution au niveau de leur base (immersion d'environ 5 cm) ; ainsi, l'apport de produit est continu. Le Tableau 8 résume les conditions testées selon les produits et l'année de test.

Tableau 8: Conditions expérimentales de l'essai 'test produits'

Année	Mode	ABA	Fluridon e	GA3	GA4	Paclobutrazol	H2O2	Pyruvate de Sodium
2015- 2016	Pulvérisation	0	0	0	0	0	-	-
	Solution	-	-	0	0	0	-	-
2016- 2017	Pulvérisation	-	-	[0-35]	[0-35]	[0-35]	[0-35]	[0-35]
	Solution	-	-	[0-35]	[0-35]	[0-35]	[0-35]	[0-35]

Nombre de jours passés en conditions naturelles après traitement des rameaux et leur mise en forçage

V. Analyse de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la dormance des bourgeons

De juillet 2015 à mars 2016, des bourgeons floraux ont été prélevés tous les mois pour les variétés 'Burlat', 'Cristobalina', 'Garnet®' et 'Regina'. Trois répétitions biologiques ont été réalisées par date de prélèvement et pour chaque variété, chaque répétition correspondant à un arbre. Pour chaque prélèvement, de juillet à mars, les bourgeons floraux (avec leurs écailles) ont été échantillonnés et directement plongés dans l'azote liquide, puis broyés également à froid.

Noémie Vimont, dans le cadre de sa thèse 'Etude de la réponse à la température de l'épigénome chez le cerisier doux' (janvier 2015-juin 2018), a réalisé à partir de ces prélèvements une étude d'expression RNA-Seq au laboratoire Sainsbury de l'Université de Cambridge.

L'ARN a été extrait à partir de 50-70 mg de poudre. Il est important de souligner que ces mêmes poudres ont été utilisées pour les dosages des composées métaboliques pour permettre de comparer précisément les résultats de dosages biochimiques avec ceux du RNAseq.

L'ARN a été extrait en utilisant le kit Qiagen RNeasy® Plant Minikit (Hilden, Germany) en ajoutant au tampon RLT 1,5% de PVP-40. Puis les banques ont été préparées avec le kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit High Throughput (96 samples, 96 indexes, Illumina, San Diego, USA) et séquençé en utilisant un appareil NextSeq500 (Illumina, San Diego, USA)) utilisant un séquençage dit « paired-end » de 75 paires de bases de longueur.

Par la suite les séquences obtenues ont été alignées sur le génome du pêcher, *Prunus persica*. (L.) Batsch, espèce très proche du cerisier (Dirlewanger et al., 2004) et dont le génome (assemblage V2.0 annotation V2.1) est disponible (<https://www.rosaceae.org/analysis/154>). L'analyse d'expression et les représentations graphiques des gènes d'intérêt ont été réalisés sous R Studio à partir des données de comptage pour chaque transcrit (TPM, transcrits par millions de reads). Les heat maps (ou cartes thermiques pour la représentation graphique des

données) ont été réalisés en utilisant les données d'expression centrées réduites (z-score), ainsi homogénéisées pour comparer les profils d'expression (Vimont et al, 2017). Les gènes conservés pour l'analyse sont ceux dont la valeur moyenne des TPM était supérieure à 15 et présentant une dynamique d'expression au cours de la dormance. Une partie des données RNAseq obtenues ont été exploitées dans ce travail.

VI. Bilan des études réalisées au cours de la thèse

L'étude des différentes phases de la dormance des bourgeons a été menée durant la thèse en utilisant un ensemble de techniques, comprenant des tests classiques de forçage pour l'évaluation des besoins en froid, l'évaluation de l'effet de produits exogènes sur la dormance, le dosage des métabolites par des techniques non ciblées (RMN du proton) ou ciblées (dosages enzymatiques) et enfin des études d'expression de gènes (RNAseq) (Tableau 9). Pour certaines de ces études, le matériel végétal analysé était commun, en particulier celui utilisé pour les dosages enzymatiques de métabolites et pour les études d'expression : les analyses ont été réalisées sur les mêmes broyats de poudre pour pouvoir comparer les résultats. Pour l'étude de l'effet de produits exogènes sur la dormance, seule la variété 'Fertard' a été étudiée car une très grande quantité de rameaux étaient nécessaires pour ces analyses. En effet, de nombreuses conditions étaient testées pour cette étude : différents produits et plusieurs dates de mise en forçage. Pour les analyses métabolomiques par RMN de proton, seulement deux lots ont été analysés, compte-tenu du coût de ces analyses : un lot de variétés issues de la core collection en état de dormance profonde et un second lot de variétés de cette même core collection en écodormance. Pour chacun de ces lots, un mélange de poudres de quantité identique pour chaque variété a été analysé. Par ailleurs, le matériel végétal a été prélevé à différentes périodes suivant le type d'analyses réalisées. 2015-2016 et 2016-2017. Enfin, une partie du matériel végétal utilisé pour les études métaboliques était déjà disponible au laboratoire (prélèvements 2011-2012) (Tableau 9).

Tableau 9 : Bilan des études réalisées au cours de la thèse

Etude	Test Utilisé	Matériel Végétal	Période	
Evaluation de la date de levée de dormance	Test de forçage	'Burlat', 'Cristobalina', 'Duron 3', 'Garnet*', 'Lapins', 'Pontaris*', 'Saint-Georges' et 'Regina'	Juillet 2015-Date de Floraison 2016	
		'Fertard'	2015-2016	2016-2017
Profondeur de la dormance	Test de forçage	Core collection de 54 variétés	2014-2015	
Effet de l'apport de produits exogènes sur la levée de dormance	Application de produits : GA3,GA4, ABA, fluridone + transfert en chambre chaude à t=0	'Fertard'	2015-2016	
	Application de produits GA3,GA4 + transfert en chambre chaude: t=0; t=14j plus tard; t=35j plus tard	'Fertard'		2016-2017
	Application de produits H2O2, pyruvate de sodium + transfert en chambre chaude: t=0; t=7j plus tard;	'Fertard'		2016-2017
Metabolomique	Dosage de Métabolites ciblé	'Cristobalina', 'Garnet*', 'Lapins', 'Regina'	2011-2012	
		'Burlat', 'Cristobalina', 'Duron 3', 'Garnet*', 'Lapins', 'Pontaris*', 'Saint-Georges' et 'Regina'	Juillet 2015-Date de Floraison 2016	
	Dosage de Métabolites non ciblé: RMN	core collection de 54 variétés	2014-2015	
	Dosage d'ABA	core collection de 54 variétés	2014-2015	
Expression de gènes	RNAseq	'Cristobalina', 'Garnet*', 'Lapins', 'Regina'	Juillet 2015-Date de Floraison 2016	

Chapitre III. Résultats et Discussion

I. Evaluation de la date de levée de dormance et des besoins en froid

L'endodormance est un état dans lequel aucun signe visible d'activité ne se manifeste. Afin de déterminer la période de levée de dormance, on utilise un test de forçage de rameaux. Le test consiste à compter le pourcentage de bourgeons ayant atteint un stade donné (stade C ou BBCH 55, Annexe 3) de développement après 10 jours de forçage à 25°C. On considère, *a posteriori* que les variétés sont sorties de dormance si au moins 50% des bourgeons floraux ont atteint le stade C, après ces 10 jours. Les besoins en froid ont été calculés pour chaque date selon le modèle dynamique (voir paragraphe II.2). Le test de forçage de rameaux a été réalisé à trois dates (14 janvier, 28 janvier et 16 février 2015 sur la core collection (Annexe 2). Les résultats ont permis de classer les variétés suivant leur état de dormance à chaque date de prélèvement (Tableau 10).

Tableau 10 : Etat de dormance des variétés de la core collection à trois dates de prélèvement

Dates de prélèvement			Portions de froid calculées (selon le modèle dynamique)	Profondeur de Dormance	Nombre de variétés
14-janv	28-janv	16-févr			
ND (P6)	ND (P7)	ND (P8)	<45	(Groupe 1)	24
D (P4)	ND	ND (P5)	45-57	(Groupe 2)	10
D (P4)	D	ND (P5)	57-71		14
D (P1)	D (P2)	D (P3)	>71	(Groupe 3)	7

D : Dormant

ND : Non Dormant

P : Pool

Des lots de variétés ayant un état de dormance comparable ont été constitués et ont été utilisés pour les analyses non ciblées (RMN du proton et dosages d'acide abscissique) qui seront présentées ultérieurement.

Pendant la période hivernale 2015-2016, le test de forçage a été réalisé sur six variétés de cerisier et un clone de merisier (Figure 20).

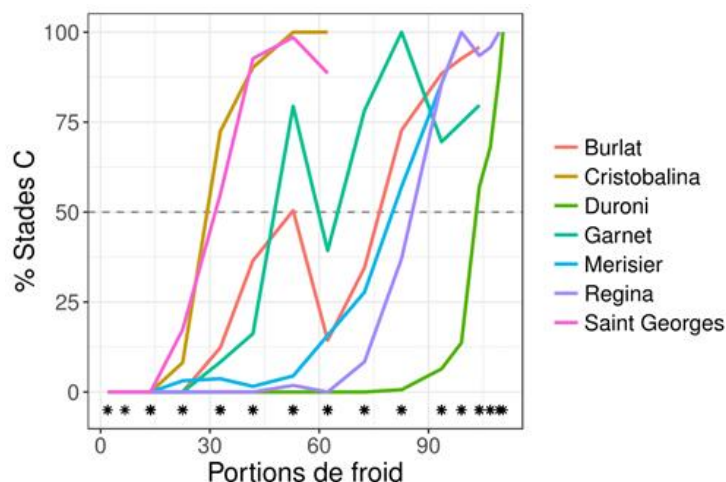


Figure 20 : Test de forçage de rameaux de 7 variétés en 2015-2016

Les étoiles indiquent les points auxquels ont été faits les prélèvements de rameaux ainsi que les bourgeons pour les analyses biochimiques et moléculaires.

Les besoins en froid des différentes variétés sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Estimation des besoins en froid (modèle dynamique) des différentes variétés étudiées

Variété	Cristobalina	Saint-Georges	Burlat	Garnet	Merisier	Regina	Duroni 3	Fertard	
Besoins en froid	30	33	77	65	80	85	103	97 (2015-2016)	105 (2016-2017)

Les variétés très précoces ('Cristobalina' et 'Saint-Georges') et très tardives ('Regina' et 'Duroni 3') ont une réponse très franche à partir d'un certain seuil de froid reçu. Pour les deux variétés intermédiaires, 'Burlat' et 'Garnet®', à partir de 30 portions de froid on observe une capacité de réponse aux températures chaudes. Néanmoins, ces deux variétés ne montrent pas le profil attendu. En effet, on observe ensuite pour les deux variétés, une nette diminution de la réponse au chaud avant une nouvelle augmentation par la suite (Figure 20). Globalement, les besoins en froid évalués comme la capacité des bourgeons à répondre au chaud semble une méthode assez satisfaisante pour la plupart des variétés. Néanmoins, cette méthode reste soumise à interprétation pour certaines variétés pour lesquelles la réponse n'est pas franche. Il semblerait que certains paramètres climatiques replongent les bourgeons en dormance, étant donnée la synchronisation de réponse que l'on observe chez 'Burlat' et 'Garnet®', deux variétés proches en termes de besoins en froid. Seules les variétés intermédiaires restent affectées par les conditions climatiques : les variétés précoces étant déjà sorties définitivement de dormance, et les variétés tardives encore dans une dormance trop profonde. On peut distinguer les phases suivantes : dormance, pré-levée de dormance, ecodormance. Ces phases seraient plus ou moins plastiques et dépendantes des conditions du milieu.

Par ailleurs, le forçage de rameaux a été également effectué sur la variété 'Fertard' pendant deux périodes hivernales consécutives 2015-2016 et 2016-2017 (Figure 21). Ce test a permis de choisir la date de réalisation des tests de produits pouvant avoir un effet sur la dormance, correspondant à la date à laquelle $\frac{3}{4}$ des besoins en froid ont été atteints (méthode utilisée en

arboriculture). Dans la Figure 21, les étoiles indiquent, pour les deux périodes, le moment auquel ont été effectués les essais de produits. De plus, on observe pour 'Fertard' une réponse aux températures chaudes plus nette pour l'année 2015-2016 que pour l'année 2016-2017 (Figure 21). Enfin, l'estimation des besoins en froid présente de légères variations en fonction des années (Tableau 11).

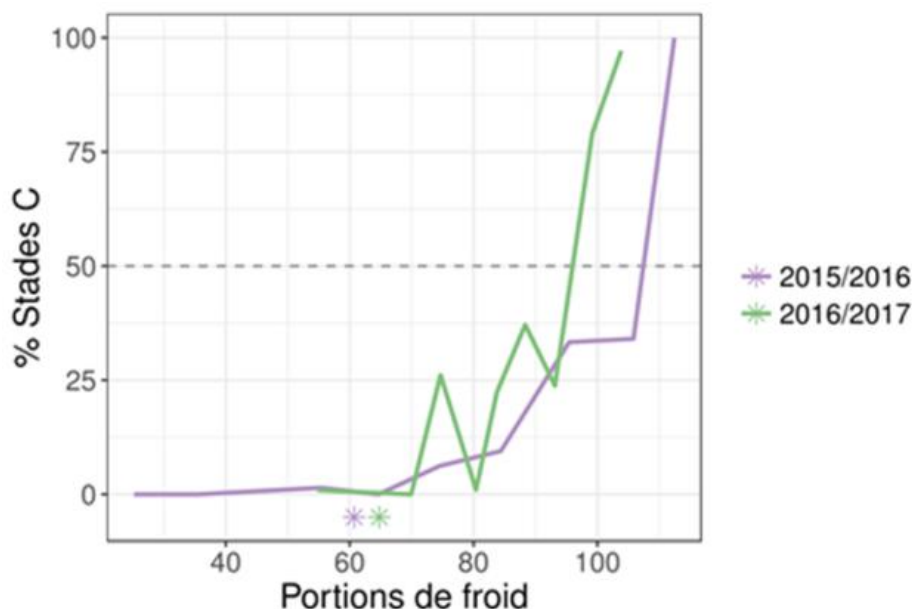


Figure 21 : Test de forçage de rameaux de 'Fertard' deux années consécutives

Les étoiles indiquent le moment auquel ont été effectués les essais de produits.

Pour estimer les besoins en froid, deux autres tests, le test de Tabuenca (1964) et le test de boutures de nœuds avec un seul bourgeon sont communément utilisés chez d'autres espèces fruitières (Bonhomme et al., 2000 ; Mauget, 1976). Ils reposent sur le même principe de réponse des bourgeons prélevés à intervalles réguliers et placés en conditions de forçage. Toutefois, chez le cerisier, le test de bouture dans les conditions qui ont été testées au laboratoire n'ont pas permis d'obtenir de bons résultats car les bourgeons séchaient rapidement. De plus ce test n'est réalisable, chez cette espèce, que pour les bourgeons végétatifs. Par ailleurs le test de Tabuenca, qui nécessite d'éliminer les écailles de chaque bourgeon, ne peut être utilisé à grande échelle. Le test de forçage de rameaux semble donc le plus approprié et le plus simple à mettre en œuvre chez le cerisier, en outre il requiert moins d'espace dans la chambre. Néanmoins, le test de forçage peut être soumis à l'influence des « corrélations inhibitrices » (inhibition de la croissance des bourgeons de la part d'un autre organe contigu, comme par exemple l'effet axe). Ces phénomènes sont difficiles à quantifier, seul le test de bouture de nœuds est supposé s'en affranchir. Néanmoins, des travaux démontrent que, même dans ce test, la réponse des bourgeons est assujettie à leur position sur le rameau. En effet, comme montré par Arias (1974) la réponse à l'ABA pendant le cycle est

dépendante non seulement de la période, mais aussi du niveau d'insertion des bourgeons sur l'axe. Dans tous les cas, ces trois tests donnent des résultats relativement proches les uns des autres, et une bonne estimation de la levée de dormance. Cependant, ils ne permettent de connaître qu'*a posteriori* l'état global de dormance des bourgeons de l'arbre. Une méthode plus directe et haut débit, via un ou des marqueurs métaboliques serait d'un grand intérêt. Notons que d'autres méthodes permettant d'évaluer l'état de chaque bourgeon individuellement et, à terme, non destructives, sont actuellement en cours d'étude. C'est le cas notamment sur matière sèche de la méthode Near Infra Rouge Spectrum (NIRS). Le principe de cette méthode est d'émettre un rayon de longueur d'onde donnée et récupérer un signal connaissant les propriétés de différents métabolites à un stade donné. Cette méthode est basée sur la même stratégie que le dosage de différents métabolites, avec une possibilité de lier différents profils à différentes phases.

II. Analyses biochimiques

Deux types d'analyses biochimiques ont été réalisés : des analyses non ciblées par RMN du proton et des analyses ciblées par dosages enzymatiques.

II.1. Analyses biochimiques non ciblées : RMN du proton

Pour les analyses métabolomiques par RMN du proton d'extraits polaires, deux lots de variétés de la core collection ont été analysés : un lot de bourgeons de variétés en état de dormance profonde (groupe 3 comprenant 7 variétés cf Tableau 10) et un second lot de bourgeons de variétés en écodormance (groupe 1 de 24 variétés, Tableau 10).

Les spectres RMN du proton 1D obtenus pour les 2 lots sont très comparables (Figure 22).

Les composés majoritaires sont les suivants (*: identification putative) :

- sucres solubles : saccharose, glucose, fructose, raffinose*, maltose*,
- acides organiques : acides malique, citrique et quinique,
- acide chlorogénique (2 formes présentes), un acide-phénol possédant un fort pouvoir antioxydant,
- catéchine, un composé de la famille des flavonoïdes et de la sous-classe des flavanols, connu comme étant également un antioxydant puissant,
- prunasine*, un glycoside cyanogène synthétisé par un grand nombre de *Prunus*,
- choline impliquée dans le métabolisme des lipides, et précurseur de la glycine bêtaïne (un osmoprotecteur (Masood et al., 2016)).

On peut noter visuellement une quantité plus importante de catéchine et d'acides citrique, malique et chlorogéniques pour le lot de variétés en endodormance (D) comparé au lot en écodormance (ND).

Ces résultats montrent une teneur plus importante en composés antioxydants dans les bourgeons pendant l'endodormance que pendant l'écodormance. Nous verrons par la suite que ces résultats sont en accord avec les hypothèses concernant le rôle important de ces composés dans les mécanismes de dormance.

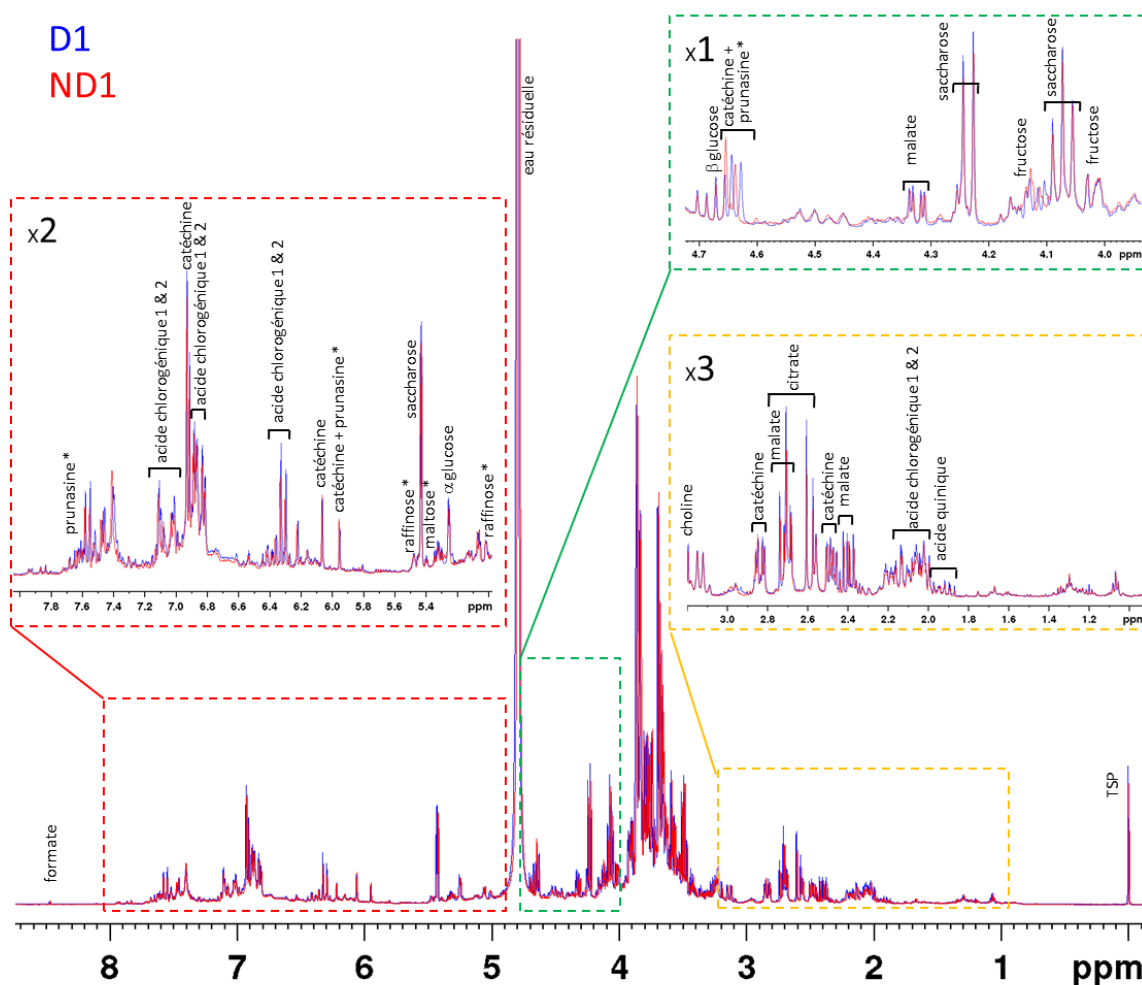


Figure 22 : Spectres RMN 1H-Identification partielle des résonances
Comparaison de spectre de pool de bourgeons dormant (D1) et en ecodormance (non dormant (ND))

II.2. Analyses biochimiques ciblées : dosages enzymatiques

II.2.1. Variation des métabolites au cours du cycle naturel chez plusieurs variétés

La Figure 23 présente le dosage de quatre métabolites au cours de la période hivernale 2011-2012 et de juillet 2015 jusqu'à la floraison 2016 chez deux variétés ayant des besoins en froid contrastés : 'Cristobalina' (faibles besoins en froid) et 'Regina' (forts besoins en froid). Pour les deux variétés, la date de levée de dormance estimée par le test de forçage de rameaux est indiquée en pointillés verticaux de la même couleur que celle utilisée pour représenter la variété. Pour une année donnée, les dosages montrent un profil similaire entre les variétés pour les quatre métabolites présentés. Les cinq autres variétés ont été dosées mais non présentées dans cette figure afin de ne pas la surcharger et son disponibles Annexe 6.

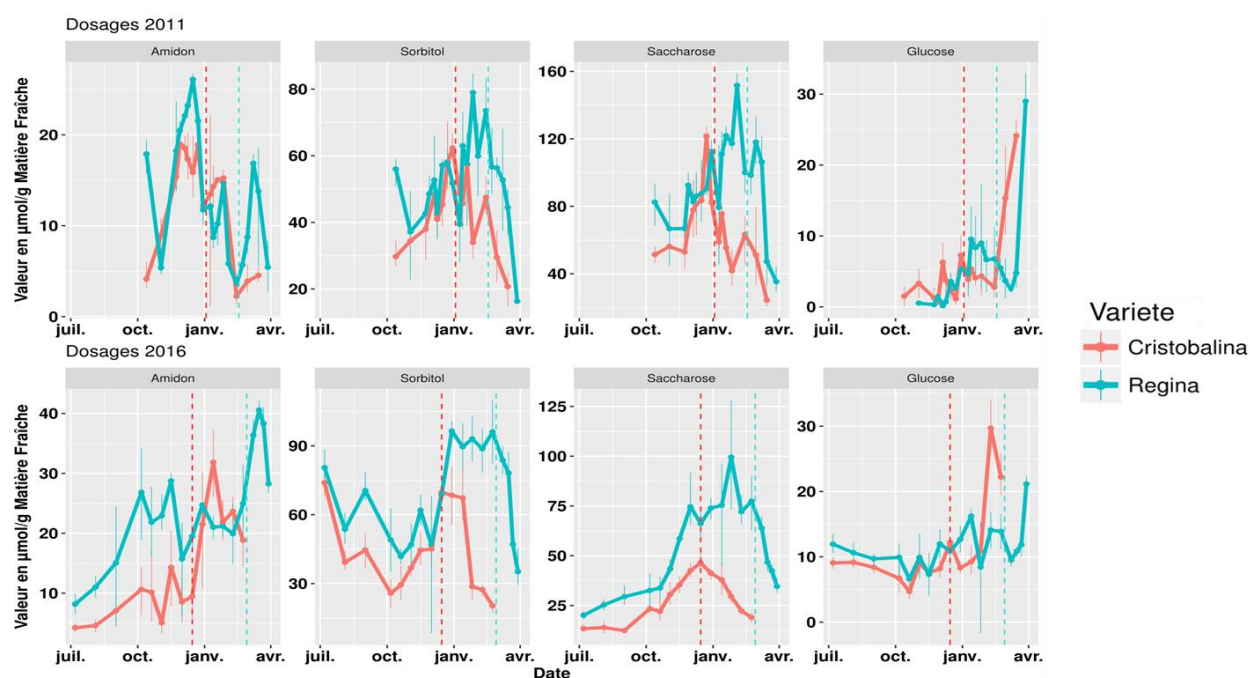


Figure 23 : Dosage de métabolites dans les bourgeons floraux de deux variétés de cerisier contrastées pour la date de floraison : 'Cristobalina' (très précoce) et 'Regina' (tardive)

Les dosages sont exprimés en μmol équivalents glucose/g MF pour l'amidon et en $\mu\text{mol/gMF}$ pour le sorbitol, saccharose et glucose.

Concernant l'amidon, on observe pour la période hivernale 2011-2012 un pic d'accumulation de ce composé en décembre, puis une diminution jusqu'en février. On note pour 'Regina' une forte augmentation en mars puis une nouvelle diminution. Pour les deux variétés, une resynthèse d'amidon est notée juste après la levée de dormance. Pour l'année 2015-2016, on observe une très nette augmentation de l'amidon de juillet jusqu'à septembre décembre. Puis, une très forte augmentation juste après la levée de dormance chez 'Cristobalina', et une stagnation des valeurs chez 'Regina' contrairement à la période hivernale 2011-2012 où les valeurs diminuaient. Enfin, après la levée de dormance de 'Regina' on observe une très forte

augmentation de l'amidon, comme pour la période hivernale 2011-2012. Nous pouvons remarquer que l'ordre de grandeur des valeurs mesurées est comparable, même si elles sont globalement un peu plus élevées pour l'année 2015-2016 ; de plus, pour la période hivernale 2011-2012, les deux variétés ont des valeurs similaires, alors que 'Regina' a des valeurs supérieures de juillet jusqu'à décembre en 2015.

Le sorbitol, pour la période 2011-2012 a un profil très similaire pour les deux variétés avec un décalage temporel lié à la date de levée d'endodormance. On observe une augmentation depuis octobre jusqu'à la date de levée de dormance estimée puis une très forte diminution. On retrouve ce profil pour l'année 2015-2016, avec une augmentation arrivant à un maximum coïncidant avec la date estimée de levée de dormance, puis une forte diminution. De plus, on note une diminution globale de ce composé de juillet jusqu'à octobre pour les deux variétés. De la même manière que pour l'amidon, on retrouve des valeurs de sorbitol qui sont du même ordre de grandeur pour les périodes 2011-2012 et 2015-2016. Les deux variétés montrent de faibles différences de valeurs la première année, mais des différences marquées la deuxième année, 'Regina' se situant presque toujours au-dessus de 'Cristobalina'. Notons enfin que, pour chaque variété, la période pendant laquelle les valeurs atteignent un maximum en 2011-2012 est plus brève qu'en 2015-2016. Pour 'Regina', cette période dure environ 3 semaines en 2011-2012 alors qu'elle couvre 5 semaines en 2015-2016.

Le saccharose, pour la période 2011-2012 a un profil très similaire entre les deux variétés avec un décalage temporel, comme pour le sorbitol. Il se produit une augmentation depuis octobre jusqu'à la date estimée de levée de dormance puis une très forte diminution. On retrouve ce profil pour l'année 2015-2016, avec une augmentation arrivant à un maximum, coïncidant avec la date estimée de levée de dormance, puis une forte diminution. De plus, on observe une augmentation globale de ce composé de juillet jusqu'à octobre pour les deux variétés, contrairement à ce qui est observé pour le sorbitol. De la même manière que pour l'amidon et le sorbitol, pour la période hivernale 2011-2012 et l'année 2015-2016, on retrouve des valeurs de saccharose qui sont du même ordre de grandeur, mais plus faibles pour la deuxième année (environ la moitié). Pour les deux années les valeurs de 'Regina' sont plus importantes que celles de 'Cristobalina'.

Le glucose, pour la période 2011-2012 a un profil très similaire entre les deux variétés avec un décalage temporel, comme pour le sorbitol et le saccharose. Les valeurs sont globalement stables sur le cycle jusqu'à une très forte augmentation environ un mois et demi après la levée de dormance estimée, qui correspond à la période de début de floraison sur le terrain. On retrouve ce profil pour l'année 2015-2016, avec des valeurs relativement stables jusqu'à la

floraison. De plus, on observe une diminution globale de ce composé de juillet jusqu'à octobre pour les deux variétés, comme observé pour le sorbitol. Contrairement aux autres métabolites qui montrent des valeurs du même ordre de grandeur entre les deux années, on observe pour les deux variétés un déséquilibre entre les deux années, avec des valeurs environ 10 fois plus faibles en octobre 2011 qu'en octobre 2015.

Les profils métaboliques des six variétés et du clone de merisier étudiés sont présentés dans la Figure 24. Ces profils mettent en lumière des similitudes entre variétés. Notamment, les sucres majoritaires sont le sorbitol et le saccharose. Les valeurs maximales pour ces deux métabolites se situent dans la période de levée d'endormance pour les variétés précoces et intermédiaires à l'exception du merisier 'Pontaris®' qui montre un décalage. Pour les variétés tardives, les valeurs maximales arrivent un peu plus précocement et se maintiennent élevées jusqu'à la période de levée de l'endormance.

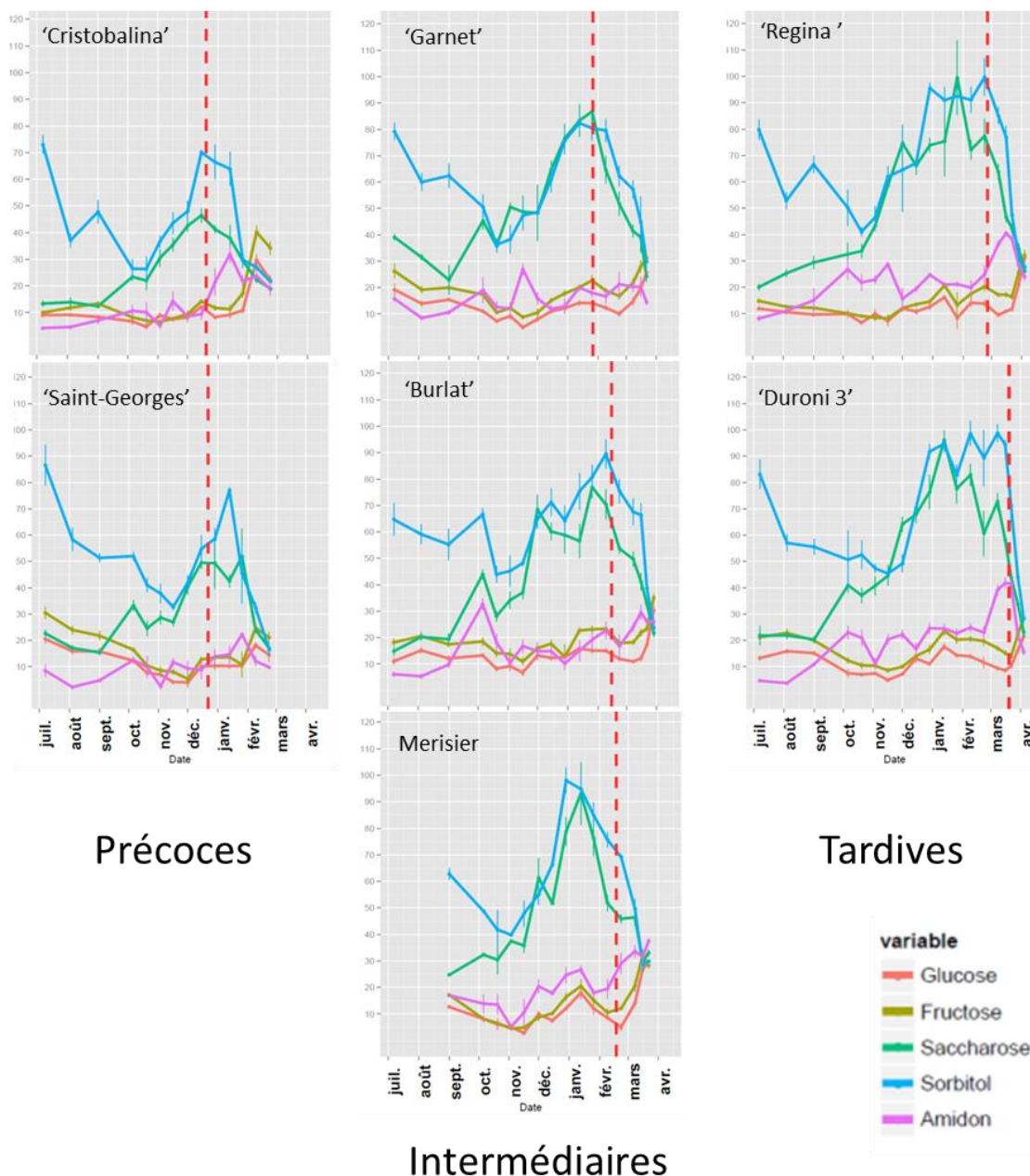


Figure 24 : Profils métaboliques des variétés étudiées en 2015-2016 (en $\mu\text{g/g MF}$)

Les résultats des deux années de dosage des métabolites sont comparables. Les différences temporelles des profils des métabolites observées entre variétés renvoient à leurs différences en termes de besoins en froid. Ainsi, ces métabolites pourraient être utilisés comme marqueurs de différentes phases de la dormance (Figure 25).

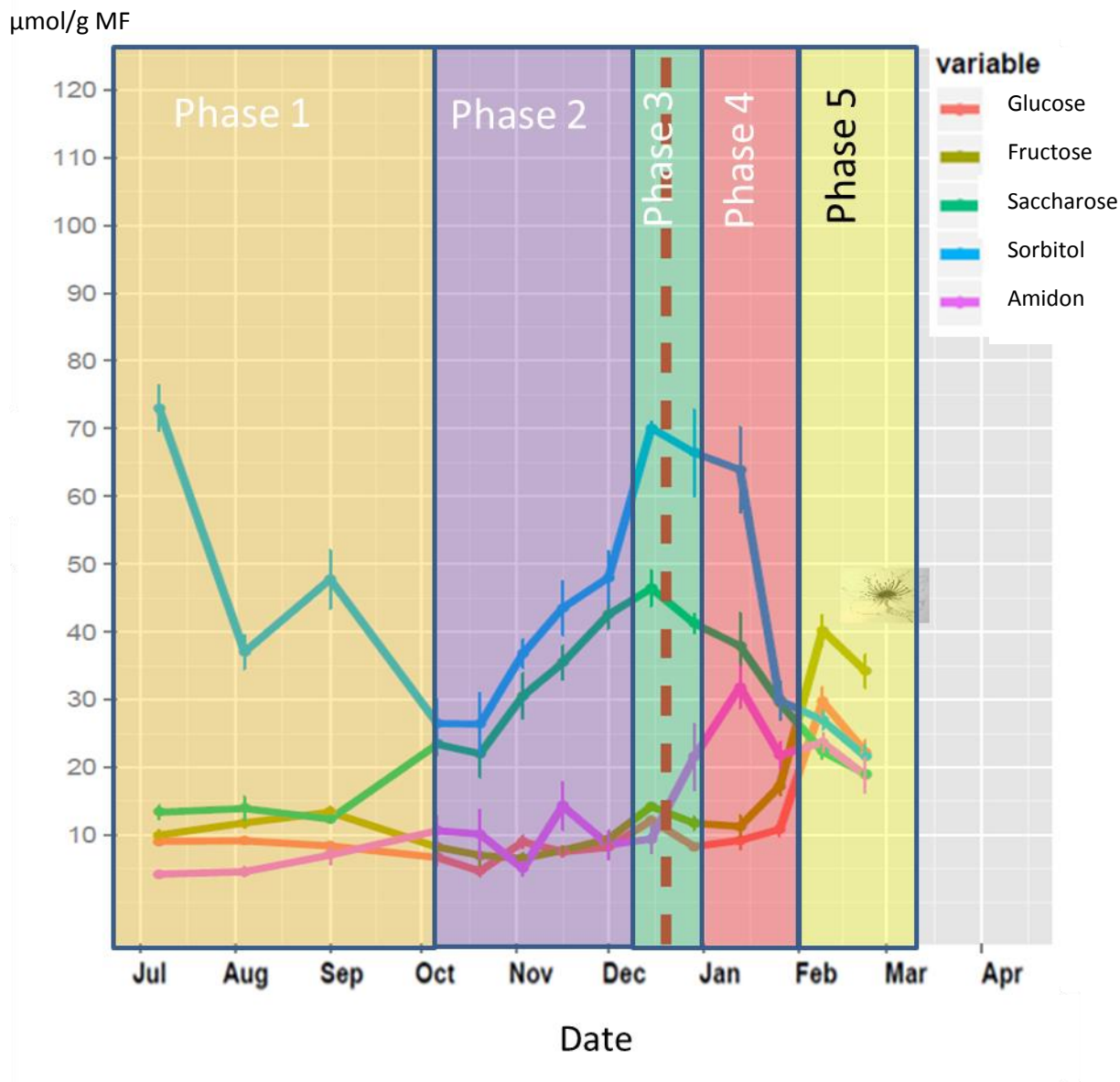


Figure 25 : Profil des différents métabolites de la variété 'Cristobalina' au cours de cinq phases du cycle

La phase 1, depuis juillet jusqu'à octobre est caractérisée par une forte diminution du sorbitol, une augmentation du saccharose, une augmentation de l'amidon et une diminution du glucose. Ainsi, cette période est celle de la mise en réserve sous forme plus complexe d'énergie, le saccharose étant un dimère de glucose/fructose, et l'amidon étant un polymère de glucose. Il serait intéressant de pouvoir doser d'une manière plus exhaustive la quantité de carbone présente dans les bourgeons, car il semble qu'il y ait une inter-conversion des sucres simples en sucres plus complexes. Toutefois, il est difficile de savoir s'il y a une accumulation provenant des feuilles ou de la sève xylémienne, notamment, ou sous d'autres formes (par exemple lipides comme chez les animaux). La chute très nette observée pour le sorbitol en octobre pour toutes les variétés semble indiquer un événement commun, qui pourrait être l'entrée en dormance (Figure 24). Ainsi, l'utilisation classique du premier octobre comme date référence pour le début de calcul de la quantité de froid reçue aurait du sens (Jones et al.,

2015; Legave et al., 2013; Schwartz and Hanes, 2010). On peut dans ce cas exclure l'hypothèse selon laquelle le cycle des variétés serait décalé dans le temps en fonction de leur précocité.

La phase 2 est la phase d'endodormance proprement dite, caractérisée par une accumulation très forte de saccharose (doublement de la valeur) ainsi que de sorbitol (triplement de la valeur). Encore une fois, on ne peut pas savoir si ces sucres proviennent de l'extérieur du bourgeon ou si c'est une inter-conversion. Selon l'hypothèse de Rinne (Rinne et al., 2011), les plasmodesmes (structures permettant la communication entre cellules) sont obstrués par de la callose et isolent les bourgeons. Dans cette hypothèse, cette augmentation serait le fait d'une inter-conversion, mais les quantités de métabolites dosés sont trop faibles pour pouvoir produire une telle augmentation. De plus, l'ouverture des plasmodesmes n'est pas forcément positivement corrélée avec la capacité de transport de ces derniers (Nicolas et al., 2017 ; Tilsner et al., 2016). On ne peut donc pas exclure l'existence d'un transport extérieur ni d'une autre source de carbone non dosée ici. Cette augmentation de sucres solubles a déjà été rapportée au cours du cycle chez une espèce pérenne en conditions naturelles (Jones et al., 1999 ; Koussa et al., 1998 ; Pagter et al., 2015). De plus, elle n'est pas observée en conditions de privation de froid (Bonhomme et al., 2005 ; Jones et al., 1999 ; Koussa et al., 1998). Il a été proposé que le rôle de l'augmentation des solutés était d'améliorer la résistance au froid (réponse à l'environnement) (Morin et al., 2007). Les profils comparables pour toutes les variétés au niveau de la phase 1 semblent être en accord avec cette hypothèse (Figure 24). Néanmoins le décalage temporel des profils entre les variétés pour la valeur maximale suggère un lien avec la levée d'endodormance.

La phase 3 est la phase de levée d'endodormance, caractérisée au départ par des valeurs maximales de saccharose et de sorbitol, mais aussi une augmentation forte de la synthèse d'amidon. La diminution du sorbitol et du saccharose, concomitante avec l'augmentation forte de l'amidon, suggère une inter-conversion vers ce dernier et probablement une utilisation directe. Cette observation a déjà été effectuée sur des bourgeons végétatifs (Jones et al., 1999 ; Koussa et al., 1998). Une partie du saccharose et du sorbitol est utilisée à des fins énergétiques ce qui semble cohérent avec l'augmentation de la capacité respiratoire des bourgeons après satisfaction des besoins en froid chez le pommier et le peuplier (Bachelard and Wightman, 1973 ; Young, 1990). L'augmentation d'amidon quant à elle, déjà observée chez des cerisiers acides qui avaient satisfait leurs besoins en froid (Felker et al., 1983), pourrait être un moyen pour la cellule de conserver de l'énergie pour la croissance ultérieure. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'application de GA₃ en continu, qui favorise la croissance et

donc l'utilisation de réserves, réduit toute capacité de débourrement après 35 jours (Figure 28).

La phase 4 est la phase d'écodormance, qui est caractérisée par une très forte diminution du saccharose et du sorbitol, une diminution de l'amidon et le début d'une forte augmentation du glucose et du fructose. Cette période correspond à une utilisation des réserves et à une accumulation de sucres simples, provenant soit de la dégradation des glucides complexes, soit de la sève xylémienne ou peut-être des deux. La phase finale de ce stade est caractérisée par un gonflement très marqué des ébauches florales dans un premier temps puis par l'ouverture du bourgeon et du débourrement. Les bourgeons qui débourrent ont pour caractéristique de devenir très sirupeux et collants, et leur volume augmente de façon considérable. On peut donc penser que pendant la première partie de cette phase d'écodormance des réserves sont utilisées et pendant la deuxième partie de cette phase on assiste à une forte accumulation de sucres provenant de la sève xylémienne. Ceci est vrai chez le pêcher avec en fin d'écodormance une augmentation du pourcentage d'eau des bourgeons (Sugiura et al., 1995 ; Yooyongwech et al., 2008). Lors de cette phase se produit une croissance qui s'intensifie à mesure qu'on s'approche de la période de floraison.

La phase 5 est la période de floraison qui ne nécessite pas de marqueur biochimique pour la caractériser. Néanmoins, à l'échelle de l'arbre entier, la période de floraison n'est pas si simple à caractériser. Il y a une période sur laquelle s'échelonne la floraison, de la même façon que la capacité des bourgeons à répondre au chaud n'est pas la même pour tous les bourgeons d'un rameau pendant la période de levée d'endodormance (phase 3).

D'une manière générale, c'est la cinétique de l'ensemble des marqueurs biochimiques au cours du cycle de la dormance qui permet de définir les phases de cette dormance. Pour avoir la meilleure estimation, il est nécessaire non seulement de se baser sur les profils métabolomiques mais également sur les connaissances dont on dispose de la variété ou de ses géniteurs. Cette méthode d'estimation des phases de dormance et donc des besoins en froid, reposant sur des analyses biochimiques, peut être utilisée pour des tests sur des individus ne présentant que peu de rameaux portant des bourgeons floraux (individus très jeunes ou en pots par exemple) puisqu'elle ne nécessite que peu de matériel végétal. Il serait intéressant de faire les mêmes dosages sur des bourgeons végétatifs pour vérifier si les deux types de bourgeons répondent de façon comparable au froid. Si cela se confirmait et s'il n'y avait pas d'effet du caractère juvénile sur la réponse au froid des bourgeons, on pourrait envisager ces tests dès le plus jeune âge dans les programmes de sélection. Par ailleurs, pour les producteurs, qui souhaitent connaître à quel moment traiter leurs vergers pour lever la dormance en situation

de non satisfaction des besoins en froid, cette méthode pourrait être une alternative au test de forçage de rameaux, très fastidieux, consommateur de matériel et nécessitant des infrastructures spécifiques (chambre climatique).

III. Etude de la voie des hormones

III.1 Effet de l'apport exogène de gibbérellines sur la profondeur de dormance

Plusieurs études ont montré que les gibbérellines actives ont un effet accélérateur sur la levée de dormance (Browning, 1973 ; Kong et al., 2015 ; Nath et Mandahar, 1988). Afin de quantifier cet effet sur le stade de dormance et la réponse aux températures chaudes des bourgeons, des rameaux dormants de la variété 'Fertard' ont été prélevés à la date à laquelle environ $\frac{3}{4}$ des besoins en froid étaient satisfaits (61 et 64 portions de froid en 2016 et 2017 respectivement). Ces rameaux ont subi une application de GA₃, GA₄ ou de Paclobutrazol, un perturbateur de la synthèse des GA par pulvérisation ou par immersion dans une solution. Le pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade BBCH 55 a été évalué dès le transfert en conditions de forçage et jusqu'à assèchement/déshydratation des bourgeons pour quantifier l'état de dormance après traitement sous deux modalités : immédiatement après le traitement ou après une accumulation de froid supplémentaire suivant le traitement.

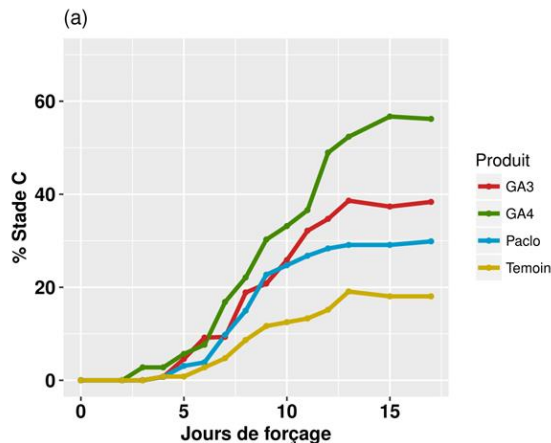


Figure 26 : Effet de la pulvérisation d'acides gibbérelliques (GA3 et GA4) et de paclobutrazol sur les bourgeons floraux de cerisier 'Fertard'

Le graphique présente l'évolution du pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C en conditions chaudes (25°C) pour la période hivernale 2015-2016.

La cinétique de réponse au chaud des rameaux traités aux Gibbérellines 3 et 4 (Figure 26) par pulvérisation montre une réponse rapide des rameaux avec un début de débourrement visible (pointes vertes) en 4 jours (Figure 27).



Figure 27 : Rameaux de 'Fertard' traités, après quatre jours en forçage

De façon globale, les résultats obtenus pour les rameaux traités avec les GA₃ et GA₄ ont montré une plus forte réponse aux températures chaudes avec un pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C plus important et plus rapidement après transfert en conditions de forçage. Ceci indique une « dormance résiduelle moins profonde » des bourgeons portés par les rameaux traités aux GA₃ et GA₄ que ceux traités au Paclobutrazol (Figure 26). De façon intéressante, le pourcentage maximal de bourgeons ayant atteint le stade C, correspondant au plateau final, semble être un bon indicateur de l'effet des GA sur le stade de dormance (Figure 28a), avec un pourcentage de stades C final supérieur après traitement avec GA₃ et GA₄.

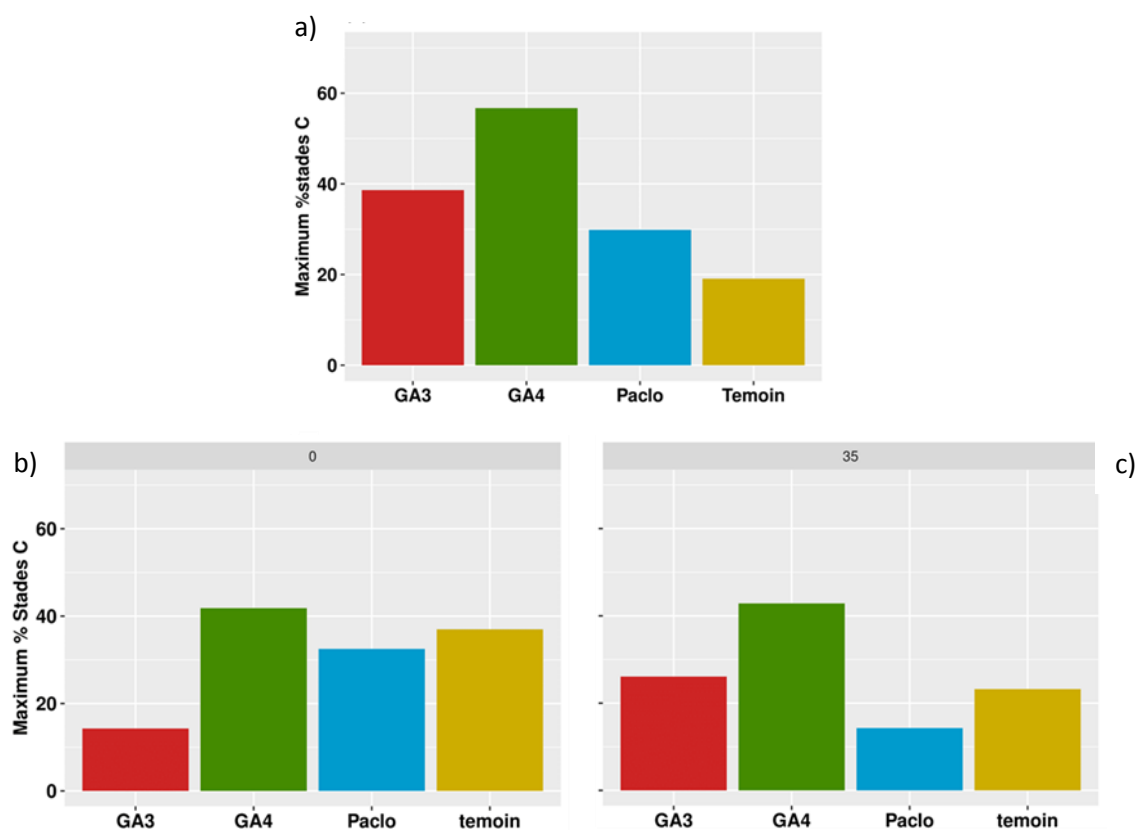


Figure 28 : Effet de la pulvérisation d'acides gibbérelliques (GA3 et GA4) et de paclobutrazol sur les bourgeons floraux de cerisier de la variété 'Fertard'

Les graphiques présentent le maximum du pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C en conditions chaudes (25°C) pour la période hivernale 2015- 2016 (a), pour la période hivernale 2016- 2017 directement après traitement (b) ou après 35 jours après traitement (c).

Ces résultats ont été confirmés pour le traitement au GA4 au cours d'une deuxième année de test, mais avec un effet beaucoup moins marqué (Figure 28b et Figure 28c) tandis que les rameaux traités avec des GA3 sont au contraire caractérisés par un pourcentage final de stade C inférieur au témoin. De plus, nous avons testé l'effet des GA3 et GA4 combiné avec du froid supplémentaire (ici 35 jours, Figure 28c) et l'effet marqué des GA4 a été à nouveau observé avec un pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C plus important que le témoin. Aucun effet significatif des GA3 n'est observé après 35 jours de froid. De plus, un possible effet inhibiteur du Paclobutrazol, avec un pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C plus faible que le témoin, est notable.

En parallèle des observations réalisées sur des rameaux traités par pulvérisation, une étude similaire a été menée pendant la période hivernale 2015-2016 avec des rameaux dont la base était plongée dans une solution de GA, c'est-à-dire un apport continu de GA sur toute la durée de l'étude.

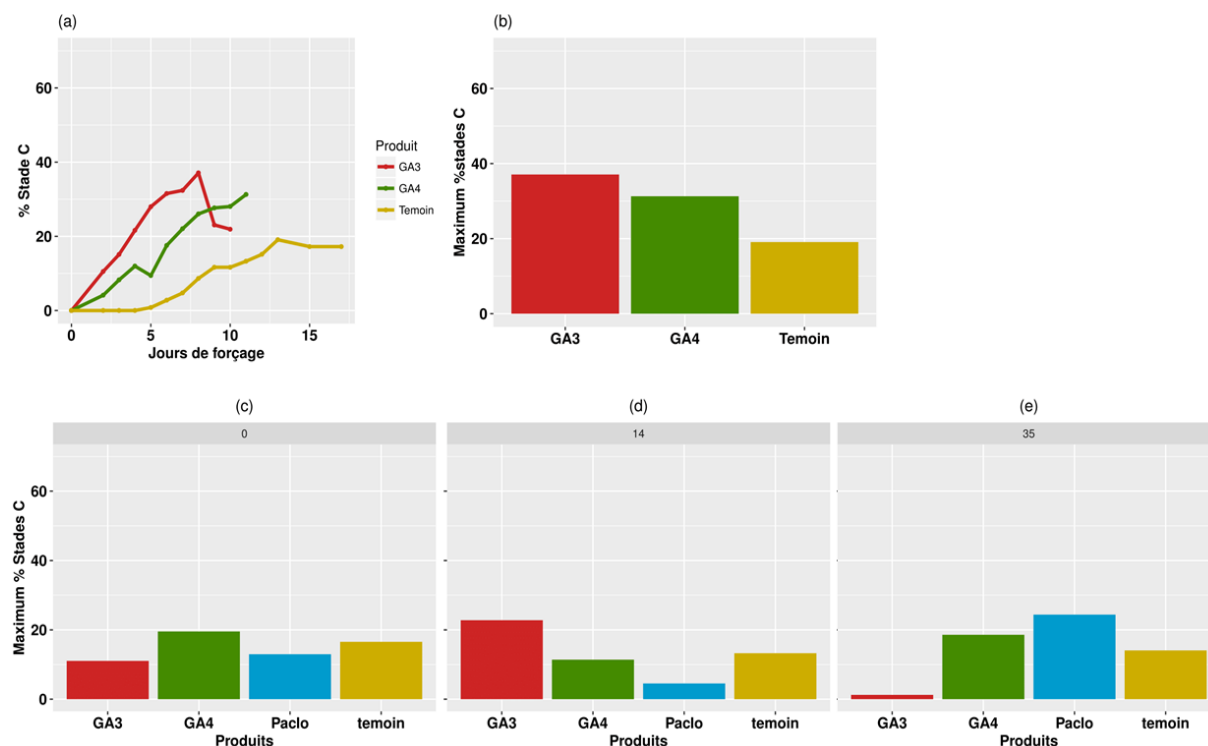


Figure 29 : Effet sur les bourgeons floraux de cerisier des acides gibbérelliques (GA3 et GA4) et du paclobutrazol en solution dans l'eau où sont placés les rameaux

La Figure 29a présente l'évolution du pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C en conditions chaudes (25°C) en période hivernale 2015-2016. Les graphiques présentent l'évolution du pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C en conditions chaudes (25°C) (a) et le maximum de bourgeons ayant atteint le stade C pour les années 2016 et 2017.

Des rameaux de cerisier de la variété tardive 'Fertard' ont été prélevés pendant la période d'endormance (17 janvier 2016 et 25 janvier en 2017). Le jour du prélèvement, les rameaux immergés dans une solution contenant les GA3, GA4 et le paclobutrazol dilués dans l'eau (période 2016-2017). Le témoin est placé dans de l'eau. En 2016, un lot de rameaux a été traité et placé à 25°C. En 2017, trois lots de rameaux sont traités, le premier est placé à 25°C le jour du traitement (c), le 2ème et le 3ème sont laissés en conditions naturelles à l'extérieur respectivement pendant 14 jours (d) ou 35 jours (e) puis placés à 25°C. Le pourcentage de bourgeons débouffés est noté tous les 2 jours pendant 20 jours (a) puis le maximum par traitement est enregistré (b,c,d,e).

Comme précédemment (pulvérisation), les GA3 et GA4 ont eu un effet accélérateur sur la réponse aux températures chaudes avec des pourcentages de bourgeons ayant atteint le stade C supérieurs au témoin tout au long de la cinétique de forçage (Figure 29a). Le même résultat est obtenu pour la valeur maximale enregistrée, avec une valeur plus importante pour les GA3 (Figure 29b). Pendant la période hivernale 2016-2017, cette étude a été reconduite en ajoutant le paclobutrazole. Trois lots de rameaux ont été traités, le premier est placé à 25°C le jour du traitement, le 2ème et le 3ème sont laissés en conditions naturelles à l'extérieur respectivement pendant 14 jours ou 35 jours puis placés à 25°C. Le pourcentage de bourgeons débouffés est noté tous les 2 jours pendant 20 jours puis le maximum par traitement est enregistré. Les GA3 et les GA4 ont également eu un effet accélérateur après 14 jours de froid suivant le traitement (Figure 29d). Néanmoins, après 35 jours de froid consécutifs au traitement, les bourgeons des rameaux traités avec des GA3 ont eu un début de réponse très rapide au chaud qui s'est accompagné d'un dessèchement complet avant d'atteindre le stade C (Figure 29e). Pour les GA4, au contraire, aucune différence marquée avec le témoin n'a été observée. De façon générale, les observations ont montré que les gibbérellines entraînent un

débourrement rapide si les rameaux sont placés aussitôt à 25°C. En revanche, lorsque les rameaux traités sont laissés en conditions naturelles puis placés en conditions de forçage, l'effet des GA semble délétère avec un dessèchement marqué des bourgeons.

III.2 Expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation des gibbérellines au cours de la dormance

Les résultats précédents ayant montré un effet des gibbérellines sur la capacité de réponse à la température des bourgeons de cerisier au cours de la dormance, les gènes impliqués dans la voie des gibbérellines ont été recherchés et leur expression a été étudiée. Soixante gènes candidats ont été identifiés dans le génome annoté du pêcher (www.rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v2.0.a1). Parmi ces gènes, 14 sont différentiellement exprimés (Annexe). Ces gènes ont été séparés en six sous-groupes pour faciliter l'analyse : les *GA20ox* et *GA3ox* qui catalysent les étapes essentielles à la biosynthèse des gibbérellines actives, les *GA2ox* qui sont impliquées dans la dégradation des gibbérellines actives, les récepteurs du signal GA. Ces gènes candidats incluent les DELLA qui ont un rôle clé pour la signalisation des GA, notamment via l'activation de l'expression des *GA20ox*, *GA3ox* et des récepteurs, et les gènes de réponse dont l'expression est potentiellement activée par la présence de GA. L'expression des gènes *RGA* et *RGL2*, codant pour des protéines à domaine DELLA, augmente pendant les phases de croissance et de développement avant l'entrée en dormance et après la sortie de dormance (Figure 30). Pour la phase de croissance précédant l'entrée en dormance (juillet à septembre), leur expression est corrélée avec l'activation de l'expression de *GA20ox*, des récepteurs *GID1B* et *GID1C* ainsi que des gènes de réponse, ce qui suggère un rôle prépondérant des gibbérellines lors de cette période de croissance active. Après la levée de dormance, l'activation de l'expression des DELLA, des gènes de réponse et des récepteurs, sauf pour 'Garnet®', pourrait caractériser une augmentation forte de la concentration en GA. Ceci est d'ailleurs confirmé par une forte augmentation de l'expression des gènes *GA20ox* et *GA3ox* au moment de la levée de dormance, voire avant, dès décembre pour *GA3ox* (Figure 28). Il est intéressant de noter que quatre gènes *GA2ox* sont exprimés entre juillet et mars avec des profils d'expression différents, suggérant un contrôle temporel, voire spatio-temporel, clé de la quantité de gibbérellines actives au cours des différentes phases de dormance.

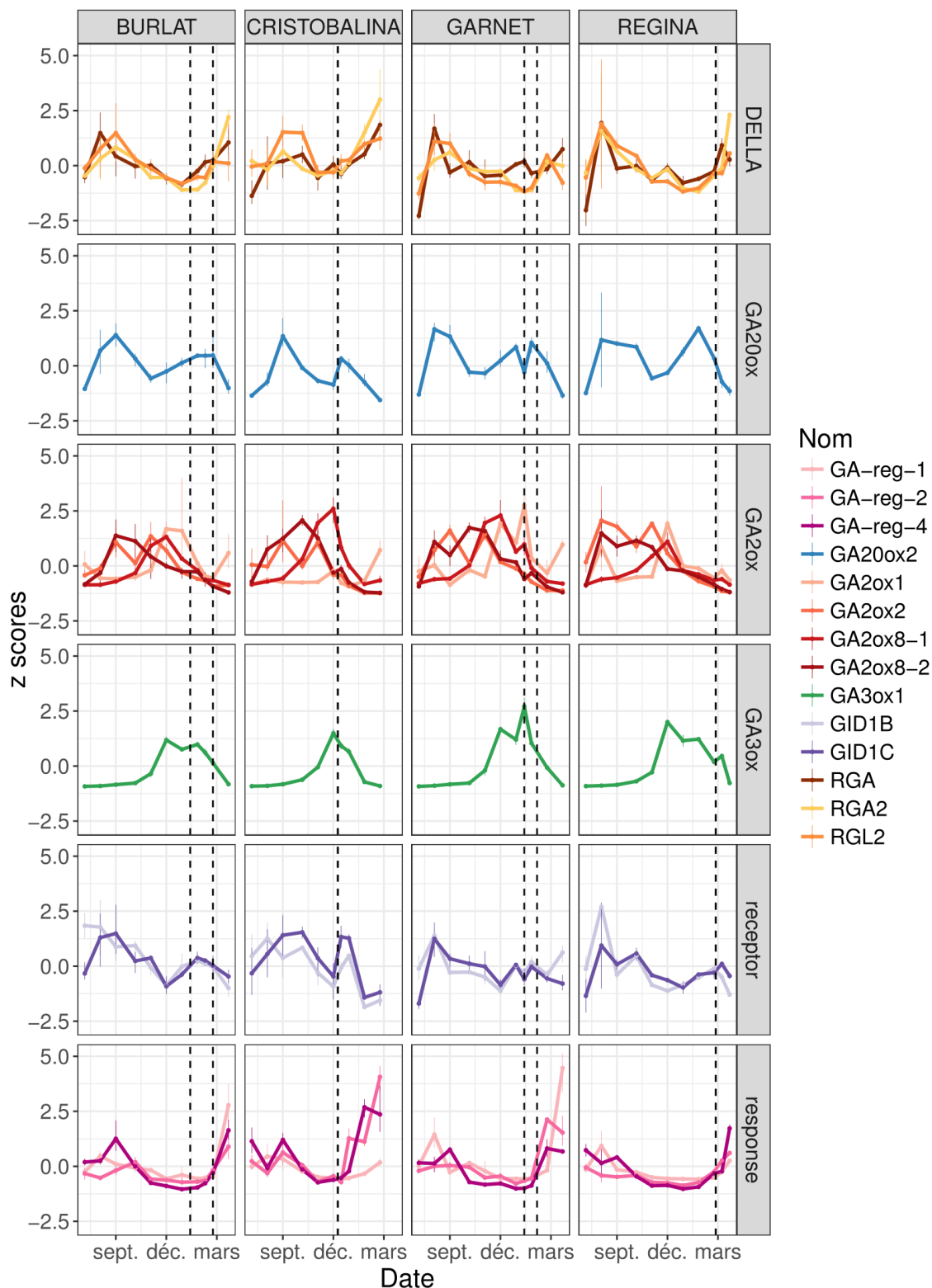


Figure 30 : Profils d'expression de gènes candidats impliqués dans la voie de signalisation des gibbérellines
 Les niveaux d'expression ont été quantifiés par RNA-seq à partir de bourgeons floraux de cerisiers depuis juillet 2015 jusqu'à la floraison 2016 chez 4 variétés contrastées pour leurs besoins en froid : très faibles ('Cristobalina'), intermédiaires ('Garnet' et 'Burlat') et forts besoins en froid ('Regina'). Les valeurs sont centrées réduites et la catégorie à laquelle appartiennent les gènes est indiquée dans le cadre à droite (DELLA/ GA20ox/ GA3ox / réponse /récepteur). La date ou l'intervalle de la levée de dormance est indiqué par les lignes verticales pointillées.

III.3 Etude du rôle de l'ABA au cours de la dormance

Afin d'approfondir le rôle des phytohormones dans le processus de dormance, des rameaux ont été traités par pulvérisation avec de l'ABA et de la fluridone, un inhibiteur de la synthèse

d'ABA, et placés en conditions de forçage. Le pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C des rameaux traités à la fluridone est rapidement plus élevé que pour le témoin (Figure 31). Cette réponse forte aux températures chaudes est maintenue tout au long de la cinétique d'observation, suggérant que l'inhibition de la synthèse d'ABA active le débourrement. L'application d'ABA retarde dans un premier temps le débourrement puis l'active en comparaison avec le témoin (Figure 31).

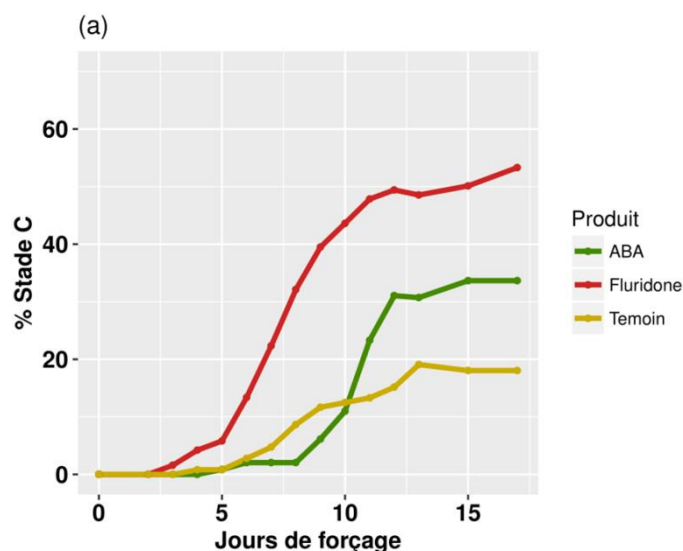


Figure 31 : Effet de l'application d'acide abscissique (ABA) et de fluridone sur les bourgeons floraux de la variété 'Fertard'

Pour approfondir le rôle de l'ABA dans la dormance, l'ABA a été quantifié à différents stades de dormance. Pour cette analyse, nous avons fait le choix de travailler sur une core collection de 54 variétés du CRB, contrastées pour leurs dates de floraison (Annexes

Annexe 1. Article : Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species : A Pivotal Role for Oxidative Cues



Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species: A Pivotal Role for Oxidative Cues

Rémi Beauvieux, Bénédicte Wenden and Elisabeth Dirlewanger*

UMR 1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael James Considine,
The University of Western Australia,
Australia

Reviewed by:

Robert D. Hancock,
James Hutton Institute,
United Kingdom
David Horvath,
Agricultural Research Service (USDA),
United States

*Correspondence:

Elisabeth Dirlewanger
elisabeth.dirlewanger@inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 16 February 2018

Accepted: 30 April 2018

Published: 16 May 2018

Citation:

Beauvieux R, Wenden B and
Dirlewanger E (2018) Bud Dormancy
in Perennial Fruit Tree Species:
A Pivotal Role for Oxidative Cues.
Front. Plant Sci. 9:657.
doi: 10.3389/fpls.2018.00657

For perennial plants, bud dormancy is a crucial step as its progression over winter determines the quality of bud break, flowering, and fruiting. In the past decades, many studies, based on metabolic, physiological, subcellular, genetic, and genomic analyses, have unraveled mechanisms underlying bud dormancy progression. Overall, all the pathways identified are interconnected in a very complex manner. Here, we review early and recent findings on the dormancy processes in buds of temperate fruit trees species including hormonal signaling, the role of plasma membrane, carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration and oxidative stress, with an effort to link them together and emphasize the central role of reactive oxygen species accumulation in the control of dormancy progression.

Keywords: bud dormancy, perennial fruit species, hormonal pathways, carbohydrate metabolism, oxidative stress

INTRODUCTION

In the context of perennial plants, bud dormancy is a crucial step in the phenology cycle, as its progression over winter determines the quality of bud break, flowering and fruiting. The term "dormancy" is associated with temporary suspension of visible growth. It comprises true dormancy ("rest" or "endodormancy") triggered by internal factors, and climatic dormancy ("quiescence" or "ecodormancy") controlled by external factors (Lang et al., 1987; Considine and Considine, 2016). These phases of dormancy are alleviated by different elements: release of endodormancy requires cold accumulation whereas ecodormancy advances with heat accumulation toward bud break. For perennial fruit species, in the context of global warming, endodormancy release may be a critical step in the future due to insufficient chill accumulation, directly affecting flowering quality and uniformity, and thus leading to a drastic reduction of fruit production. In the past decades, much work has been done to unravel the mechanisms underlying dormancy period, and the diversity of approaches used is indicative of the complexity of the trait. Early studies at the beginning of the 20th century mainly dealt with the observation of the phenomenon itself and the effects of dormancy alleviating molecules. In the 70s, advances in microscopy and subcellular techniques allowed novel observations of cellular modifications over the dormancy period. Later, between 1980 and 2000, physiological studies including metabolic analyses led to further description of the main pathways involved, more recently highlighted by genetic and genomic studies. Numerous studies, notably transcriptomic analyses, have led to the identification of common molecular pathways regulating bud dormancy in trees (Rohde et al., 2007; Ruttink et al., 2007; Yamane et al., 2008; Jiménez et al., 2010; Leida et al., 2010; El Kayal et al., 2011; Liu et al., 2012; Bai et al., 2013; Zhong et al., 2013; Xu et al., 2016; Tarancón et al., 2017). Specific gene expression patterns over the course of dormancy featured hormone signaling, carbon metabolism, stress response and chromatin

modification (Regier et al., 2010; Rios et al., 2014; Saito et al., 2015; Wisniewski et al., 2015; Wen et al., 2016). Among the main pathways identified, the *Dormancy-Associated MADS-BOX (DAM)* genes have been a constant interest since they were proposed to cause the non-dormant phenotype of the *evg* mutant of peach (Rodriguez et al., 1994; Bielenberg et al., 2004, 2008; Howe et al., 2015). In peach, the six tandem-arrayed *DAM* genes display distinct seasonal patterns with peaks in expression at different times during dormancy (Li et al., 2009), supporting their role in promoting and maintaining dormancy (Jiménez et al., 2010; Hao et al., 2015). Following this finding, *DAM* genes and their involvement in dormancy have been extensively studied in perennial plants including leafy spurge (Horvath et al., 2008; Anderson et al., 2010), apple (Mimida et al., 2015), Japanese pear (Ubi et al., 2010; Saito et al., 2013), tea plant (Hao et al., 2017), Kiwifruit (Wu et al., 2017), and Japanese apricot (Yamane et al., 2008; Sasaki et al., 2011). In poplar, genes homologous to *CONSTANS (CO)* and *FLOWERING LOCUS T (FT)* have key roles in the control of dormancy (Bohlenius et al., 2006; Hsu et al., 2011; Srinivasan et al., 2012) and the chill-induced release of endodormancy (Rinne et al., 2011). Recent reviews have nicely described the molecular advances in dormancy studies (Cooke et al., 2012; Rios et al., 2014; Sanchez-Perez et al., 2014) therefore we will not focus our attention on these aspects. Overall, all these pathways are interconnected in a very complex manner and so far no integrative scenario has been proposed to precisely describe their interactions. Nonetheless one particular pathway seems central and is almost always highlighted in the recent studies: the response to oxidative stress and the reactive oxygen species (ROS). Notably, most of the studies using dormancy release substances such as HC (Hydrogen Cyanamide) show they induce the ROS scavenging systems. Interestingly, ROS are also thought to be a key signal during plant development for many aspects including dormancy (Considine and Foyer, 2014), as shown by their link to the hormonal interplay, cell wall loosening, and ion channels in seeds. Here, we review both early and recent findings on the dormancy processes in buds of temperate fruit trees species including hormonal signaling, the role of plasma membrane, carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration and oxidative stress, with an effort to link them together and emphasize the central role of ROS accumulation in the control of endo- and ecodormancy progression.

OXIDATIVE STRESS AND REDOX CUES

In contrast to chilling-induced breaking of dormancy, exposing dormant buds to sub-lethal freezing and high temperatures as well as other sub-lethal treatments for a short period of time can overcome rest relatively rapidly (Orflier and Goussard, 1980; Nee and Fuchigami, 1992). Following these observations, numerous lines of evidence have highlighted that stresses, especially oxidative and respiratory stresses, are involved in the release of buds from dormancy. These stresses trigger the production of ROS, which have been shown to be critical throughout plant life and development (Considine and Foyer, 2014). This production of ROS including H_2O_2 in buds suggests

that they may act as key signaling molecules for dormancy release (Kuroda et al., 2002, 2005; Pérez and Burgos, 2004; Prassinis et al., 2011; Vergara et al., 2012; Hussain et al., 2015; Tan et al., 2015). These hypotheses are further supported by observations that exogenous H_2O_2 can substitute for chilling, thus confirming that an increase in H_2O_2 levels may activate the sequence of reactions involved in the breaking of bud dormancy (Pérez and Burgos, 2004; Kuroda et al., 2005; Pérez et al., 2008). Conversely, treatment of potato tuber with a NADPH oxidase inhibitor leads to decreased ROS production and delayed dormancy release (Liu et al., 2017). In plant cells, ROS are continuously produced as a consequence of aerobic metabolism in all the intracellular organelles. Cells have the capacity to rapidly produce and scavenge different forms of ROS levels, as a result of a balance between formation and detoxification rates, with a tight link to cellular metabolism, making ROS good signals to monitor changes in cellular metabolism (Mittler et al., 2011). Another indication that oxidative stress is an important part of the process of dormancy is that antioxidant defense and detoxification pathways are upregulated during dormancy release, including catalase (CAT), glutathione peroxidase (GP), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase superfamily proteins (Scalabrelli et al., 1991; Or et al., 2000; Halaly et al., 2008; Leida et al., 2010; Prassinis et al., 2011; Vergara et al., 2012; Viti et al., 2012; Bai et al., 2013; Zhuang et al., 2013; Guzicka et al., 2017). This is especially true for buds treated with dormancy-breaking compounds. In apricot flower buds, gibberellic acid 4 (GA_4) treatment upregulates oxidation-reduction proteins and the authors hypothesized that GA_4 application led to the development of oxidative stress and to subsequent dormancy release (Zhuang et al., 2013). HC has been widely used by growers to overcome low and uneven bud break and the mechanisms that underlies its dormancy-breaking effect is extensively studied in fruit species. Many studies show that a significant increase in H_2O_2 levels is the main metabolic change produced by HC, often linked to an inhibition of CAT activity (Bartolini et al., 1996; Pérez and Lira, 2005; Halaly et al., 2008; Pérez et al., 2009; Tan et al., 2015). However, recent genomic studies show that a wide range of genes is differentially regulated after HC application such as genes related to cell wall loosening, hormonal response, carbohydrate and protein metabolism (Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Liu et al., 2015; Sudawan et al., 2016; Ionescu et al., 2017) thus linking oxidative stress, mitochondrial activity, hypoxia, cytokinins, auxin, jasmonate and ethylene signaling pathways to HC-induced dormancy release. Based on these findings, HC application is thought to trigger transient oxidative stress and activate detoxification systems. Subsequently, most pathways proposed to be involved in dormancy release are activated: degradation of callose, inhibition of abscisic acid (ABA), GAs, glycolysis, cytokinins (Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Zheng et al., 2015; Ionescu et al., 2017). Another clue for the involvement of ROS during dormancy is the response of several ROS scavenging systems that were closely analyzed during bud dormancy. The glutathione and ascorbate pathways are crucial for the detoxification of H_2O_2 . The overall content of glutathione was shown to increase in concomitance with the endodormancy

overcoming. Moreover, the ratio between reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, was reported to be associated to the dormancy stage: higher levels of GSH at the end of rest compared to beginning of the phase (Siller-Cepeda et al., 1992; Wang and Faust, 1994; Kocsy et al., 2001; Bartolini et al., 2006). This ratio has been shown to be under the control of the glutathione reductase (GR) activity in Japanese pear (Zanol et al., 2010). In dormant grapevine buds, HC upregulates genes involved in ascorbate, glutathione and pentose phosphate pathway (PPP) detoxification pathways (Pérez et al., 2009; Sudawan et al., 2016). Temporary induction of the PPP in response to oxidative stress may provide a way to recharge the system with NADPH for detoxification through the ascorbate/glutathione system (Figure 1). Such an induction has been observed in apricot buds after a treatment with GA₄ (Zhuang et al., 2015), thus allowing the production of NADPH in the absence of mitochondrial respiration. All these studies provide evidence that ROS play a crucial role during dormancy and raise the questions of the mechanism involved in the oxidation system, especially how other pathways interact or are directly controlled by oxidative cues.

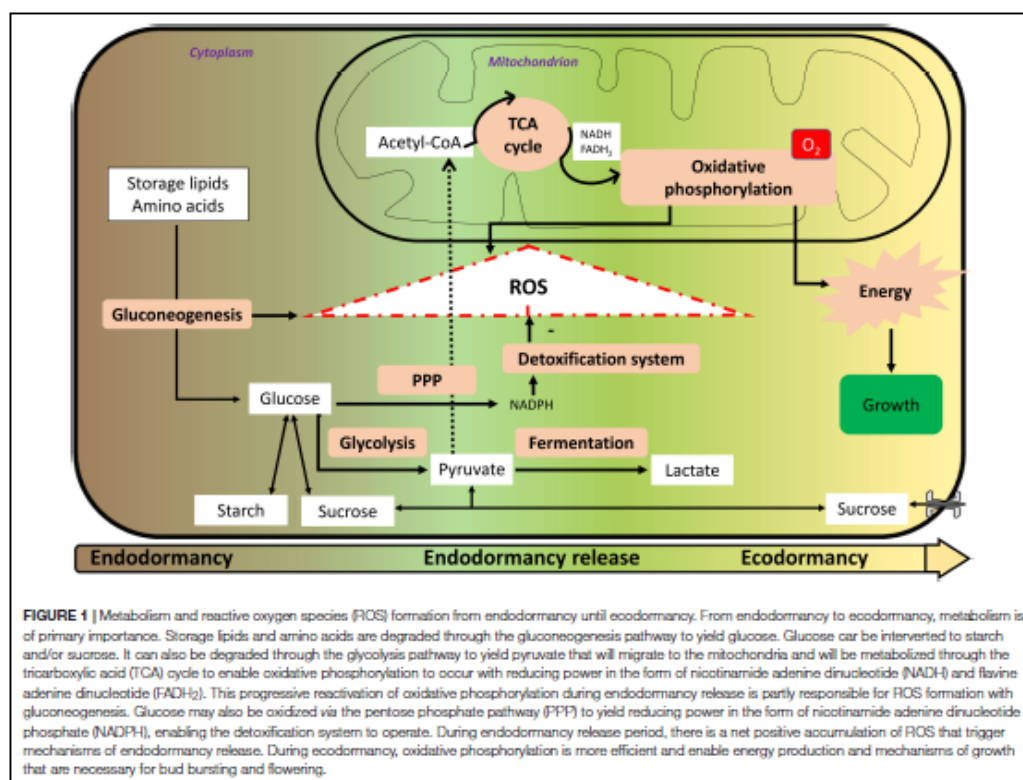
MITOCHONDRIAL RESPIRATION

Mitochondrial respiration is the primary cellular source of ROS on non-photosynthetic tissues in the context of healthy conditions (Van Aken et al., 2009), whereas plasma membrane and cell-wall NADPH/NADH oxidases are major producers in the context of defense response (Davies et al., 2006). An elevation of ROS production is noted in abnormal conditions, such as hypoxia or hyperoxia (Turrens, 2003). During dormancy, hypoxia and the inhibition of mitochondrial respiration can be responsible for the increase in ROS content observed in dormant buds (Vergara et al., 2012; Meitha et al., 2015, 2018), potentially by activating gluconeogenesis, and therefore enhances grape bud dormancy release (Ophir et al., 2009; Rubio et al., 2014; Sudawan et al., 2016). Likewise, O₂ deprivation raises glycolysis and ethanolic fermentation which could lead to the production of ROS (Pérez et al., 2009). Moreover, treatment of isolated grape bud mitochondria with sodium azide, another dormancy release molecule, inhibited O₂ uptake (Pérez et al., 2009) and mitochondria under hypoxia have been shown to have less TCA cycle enzyme activities and reduced ATP production in maize and potato (Considine et al., 2017). In response to shortening photoperiod and low temperature, respiration may be impaired as part of the growth cessation and dormancy onset processes. For example, ABA, which participates to dormancy maintenance, has been shown to inhibit certain isoforms of the tricarboxylic acid (TCA) cycle isozymes in floral buds of peach (Oncelay et al., 1979) or sucrose transporters in vine (Murcia et al., 2015), thus comforting the hypotheses that respiration processes are affected during dormancy. All these elements suggest that a respiratory stress must be involved in the release of buds from dormancy through abnormal positive net production of ROS.

Regulation of respiration is central to the transition from rest to metabolically active state, generating the ATP needed for cell

functioning and growth. In aerobic respiration, mitochondria carry out the final steps of this process and generate the bulk of ATP through (i) the TCA cycle, (ii) the oxidative phosphorylation electron chain, (iii) the alternative oxidase (AOX), and (iv) the set of carriers and channels that provide the substrates and cofactors from the cytosol. Respiration rate and depth of dormancy were shown to be inversely related in grapevine buds (Parada et al., 2016), associated with contrasted response to temperature and glucose, two stimuli that normally increase respiration in plant tissues. While respiration in non-dormant buds rose sharply in response to both stimuli, respiration in dormant buds was only slightly affected, thus suggesting that respiration is inhibited in dormant buds. Several processes can explain this repression of mitochondrial respiration during dormancy. Firstly, some studies report that mitochondria activity might be altered over dormancy progression, with modifications in their number (Felker et al., 1983) or their structure (Guzicka et al., 2017), and could be linked to availability of oxygen and requirements of oxidative phosphorylation (Considine et al., 2017). Thereafter, respiration in dormant bud cells might be affected. Secondly, as described before, dormant cells are subjected to carbon starvation and repression of cell-to-cell transport, coupled with bud scales that have low oxygen permeability. Analyses of gene expression and O₂ pressure measurements suggest that dormant buds reside in a hypoxic state and return to the oxygenated state during bud burst (Meitha et al., 2015). According to experiments on O₂ consumption and CO₂ production of grapevine twigs in hypoxic conditions (solution of chlorpromazine) or normal conditions, fermentation pathway has been suspected to be involved in dormancy release (Pouget, 1965). Recent findings on transcript abundance of key genes such as lactate dehydrogenase or alcohol dehydrogenase tend to confirm the activation of the fermentation pathway in dormant bud cells under chilling or dormancy-breaking reagent treatments (Or et al., 2000; Halaly et al., 2008; Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009), which is characteristic of low-oxygen conditions. Furthermore, plasma membrane properties are modified during dormancy and we hypothesize that chill modifies the properties of membrane-bound proteins, as was shown for the succinate oxidase activity for mitochondria of Jerusalem artichoke tubers (Chapman et al., 1979): the Arrhenius activation energy was high during dormancy and decreased at the termination of dormancy. Finally, it has been proven that the level of ATP or the ATP/ADP ratio change over dormancy progression: low levels of ATP are characteristic of endodormancy while a steep rise in ATP/ADP ratio marks the end of ecodormancy (Bonhomme et al., 2000). The mitochondrial ATP synthase complex requires inorganic phosphate delivery by the mitochondrial phosphate transporter (MPT). The expression level of MPT is low during dormancy and up-regulated to promote respiratory rate and energy metabolism for bud dormancy release in tree peony (Huang et al., 2008; Zhang et al., 2016). These results are consistent with the hypothesis that phosphate is compartmentalized during dormancy (Bonhomme et al., 2000) leading to the inhibition of respiration and ATP production.

According to all these knowledge, the role of the mitochondrial respiration during the different phases of



dormancy is proposed in **Figure 1**: during endodormancy, hypoxia and the inhibition of mitochondrial respiration can be responsible for the increase in ROS content that reach a maximum at the endodormancy release, and at this stage, recovery of mitochondrial respiration during the ecodormancy period.

CARBOHYDRATES METABOLISM

In addition to the role of mitochondrial respiration toward positive ROS production, carbohydrate metabolism seems to be crucial for ROS systems. During dormancy, a carbon starvation is noted, and glucose is a key molecule. It may be produced via storage molecules such as lipids, notably through beta-oxidation and neoglucogenesis, responsible for a net ROS production (Dieuouide et al., 1992). On one hand, glucose may be processed in the glycolysis and then metabolized in the mitochondria for ROS production; on the other hand, it may be processed through the PPP to yield reducing power and participate to ROS detoxification. For example, in yeast, it has been shown that low glucose amounts induce a decreased mitochondrial ROS

production (Barros et al., 2004). Interestingly, it has been shown that a switch from glycolysis to PPP during germination in *Arabidopsis* seed is a scavenging system for oxidative stress (Arc et al., 2011).

In addition to its crucial role in the response to cold, carbohydrate metabolism appears essential in the transition from dormancy to active bud growth (**Figure 1**), as suggested by Park et al. (2009) and Signorelli et al. (2018). Changes in carbohydrate dynamics were linked to changes in dormancy status in sweet cherry with a degradation of starch into soluble sugars during dormancy onset and an increase in starch just before budburst (Kaufmann and Blanke, 2017). In parallel with starch dynamics, soluble sugars were shown to increase between autumn and winter followed by a significant decrease between winter and spring (Charrier et al., 2017). The bud capacity to burst is tightly linked to its supply in carbohydrates and as described previously, the carbohydrate uptake capacity increases in the bud after dormancy release with an increase in the expression and activity of plasma membrane transporters. Just before budburst, all sugars are transported in the sap toward the buds but during endodormancy, carbohydrate dynamics are restricted to the bud tissues. Tarancón et al. (2017) proposed that growth

cessation and bud dormancy are consequences of carbon supply starvation syndrome linked to the sugar deficit. Over dormancy progression, and in response to winter conditions, soluble compounds (sucrose, glucose) are synthesized from the reserves accumulated during the growing season, such as starch grains (Felker et al., 1983; Guzicka, 2001; Xu et al., 2016; Guzicka et al., 2017). Interestingly, poplars overexpressing sucrose phosphate synthase – which accumulate more sucrose and starch than the wild-type poplars – are characterized by accelerated bud break, raising the possibility that enhanced sugar and/or starch reserves can promote accelerated dormancy breaking (Park et al., 2009). However, in the context of low carbon supply, it is possible that the gluconeogenesis pathway is activated to produce glucose from non-carbohydrate sources (Figure 1) as reported by Ruttink et al. (2007), associated with the generation of ROS. Similar pathway was described in dormant seeds (Einali and Valizadeh, 2017). In addition, a recent study showed that sucrose was synthesized during GA₄-induced dormancy release (Zhuang et al., 2015), thus confirming the link between soluble sugars content and end of endodormancy.

During dormancy, glucose is metabolized in at least three pathways involved in the cell processes: the PPP leading to a detoxification system, glycolysis that synthesizes the pyruvate necessary for mitochondrial respiration, and fermentation producing lactate (Figure 1). We propose that the balance between all three pathways is key in the control of dormancy release.

HORMONAL SIGNALING

Phytohormones are plant molecules that are produced within the plant and control most, if not all, developmental aspects of plant life (Davies, 2013). ROS and hormones have been shown to act in an interdependent manner (Barba-Espin et al., 2010; Bahin et al., 2011; Oracz and Karpiński, 2016). For example, a recent study has shown this close link between the pathways with an inhibition of ROS formation by ABA, and a promotion of ROS formation by gibberellins (GAs) in seeds during cold stratification (Amooaghaie and Ahmadi, 2017), and conversely ROS mediate ABA and GA regulation through their catabolism and biosynthesis, respectively (Liu et al., 2010).

Hormonal pathways, including ABA, GAs, ethylene, auxin and cytokinins, have been demonstrated to be of great importance in the bud dormancy process (Mielke and Dennis, 1978; Rodríguez and Sánchez-Tamés, 1986; Wang et al., 1987; Piola et al., 1998; Ophir et al., 2009; Doğramacı et al., 2013; Zhuang et al., 2013; Wen et al., 2016; Signorelli et al., 2018). Auxins were reported to be present at different concentration in buds throughout dormancy progression. Dormancy onset and cold treatment induces a reduction in auxin while quantity of auxins rises in ecodormancy until budburst as shown in hazelnuts (Rodríguez and Sánchez-Tamés, 1986) and grapevine (Aloni et al., 1990). It has been shown that auxins can be oxidized by two mechanisms in plants, a H₂O₂-dependent pathway, and a molecular dioxygen pathway, via peroxidases and membrane-bound

NADPH oxidases (Pfeiffer and Höftberger, 2001; Kawano, 2003). Oxidation of auxin may thus yield ROS and be part of their generation during endodormancy progression. In addition, it has been shown in apple that genes related to auxin transport are major regulators of dormancy (Porto et al., 2015), and thus we could make the hypothesis that auxins may be involved to the propagation of the ROS signal through different territories, as this ROS signal propagation has been shown in grape buds during bud bursting (Meitha et al., 2015). Transcriptomic analyses of dormant buds suggest that brassinosteroid, salicylic-acid-, and jasmonic-acid-associated genes are differentially regulated during dormancy (Howe et al., 2015). The ethylene pathway is interesting when focusing on dormancy and oxidative stress signaling. Indeed, ethylene induced bud break in grapevine buds (Ophir et al., 2009) and low-temperature stress and HC treatment, closely linked to oxidative cues as stated before, provoke ethylene biosynthesis, associated with chilling requirement and dormancy release in peach and sweet cherry (El-Shereif et al., 2006; Del Cueto et al., 2017). In addition, the ethylene biosynthesis pathway, starting with ethylene precursors methionine and ACC, increases during endodormancy, resulting in the production of ethylene but also of hydrogen cyanide, therefore leading to increased levels of ROS (Ionescu et al., 2017). In seed dormancy, ABA and GAs act antagonistically thus it is not surprising that both pathways and their interaction have been closely studied in the context of bud dormancy (Rodríguez-Gacio Mdel et al., 2009). ABA has been demonstrated to promote shoot growth cessation and bud dormancy establishment (Le Bris et al., 1999; Guak and Fuchigami, 2001) whereas GA promotes growth and dormancy release (Rinne et al., 2011). In fruit trees, increases in bud ABA content have been reported at the beginning of endodormancy in the fall (Gotz et al., 2014; Wang et al., 2016; Tuan et al., 2017; Li et al., 2018) followed by a rapid drop in response to cold (Leida et al., 2012) or dormancy-breaking agents (Seif El-Yazal et al., 2014; Zheng et al., 2015), accompanied by changes in the expression of genes related to ABA biosynthesis and degradation. Several studies showed that the expression of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases (NCED), involved in ABA synthesis, is activated during dormancy induction and maintenance (Fennell et al., 2015; Wang et al., 2016; Chao et al., 2017; Li et al., 2018). In addition, after chilling requirements are satisfied, ABA levels decrease under the control of ABA 8'-hydroxylase (encoded by *CYP707A*), which is up-regulated during dormancy release (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2016; Tuan et al., 2017; Li et al., 2018). Alternatively, inhibition of active ABA might be related to the production of conjugated forms of ABA that increases in response to cold temperatures: glucose ester of ABA (ABA-GE) in *Vitis* (Koussa et al., 1994) and an ABA-isomer in cherry (Gotz et al., 2014). Interestingly, recent studies have indicated that early cultivars of Japanese apricot contained less ABA during dormancy than late cultivars (Wen et al., 2016), thus suggesting a dose-dependent control of dormancy. Interestingly, a close relationship between ABA and ROS has been shown not only during stomatal closure but also for seed dormancy. Notably, exogenous ROS application diminished ABA concentration in barley seeds during the after-ripening period (Wang et al., 1998), and increased its catabolism

by up-regulating *CYP707A* genes in *Arabidopsis* during seed imbibition (Liu et al., 2010). Moreover, treatment of sunflower seeds during this after-ripening period enhances ROS production (Oracz et al., 2007), similarly to many studies including HC treatment on bud in various species. Thus, even though no studies have demonstrated these connections of ROS and ABA in buds, they are well known in various seed tissues. Therefore, as proposed by Leida et al. (2012), similar mechanisms may occur in bud dormancy. More precisely, we may compare the seed after-ripening period with bud endodormancy stage, while the imbibition process in seed may be similar to the ecodormancy period in buds. Nevertheless, the effect of ABA on bud dormancy is still not entirely understood, and ABA may control growth inhibition rather than play a direct role on dormancy regulation as suggested by Ramina et al. (1995) when they did not identify any strict relationship between ABA quantity and dormancy release in peach buds. Sensitivity to ABA may fluctuate as well, as shown in dormant pea seedling, where ROS inhibits the ABA signaling pathway during the imbibition period (Meinhard and Grill, 2001; Barba-Espin et al., 2010).

Gibberellic acids are particularly important as they may act in the growth renewal process during dormancy release. In fruit trees, several studies pointed out their implication in the control of dormancy progression, although few studies quantified them directly, but focused on their metabolism and on the effect of exogenous application. GA application may even substitute for chilling (Brown et al., 1960; Saure, 1985; Reinoso et al., 2002; Rinne et al., 2011; Zhuang et al., 2013) and GAs synthesis is promoted by dormancy breaking reagents (Seif El-Yazal et al., 2014). Nevertheless, the highest levels of GA₁ and GA₃ were found in dormant buds during endodormancy release and diminished afterwards (Luna et al., 1990; Wen et al., 2016). Overall, this is supported by expression analyses, with the up-regulation of *GA3-oxidase* (*GA3ox*) and *GA20-oxidase* (*GA20ox*), responsible for bioactive GA synthesis, under chilling treatment (Rinne et al., 2011) or around dormancy release (Bai et al., 2013; Wen et al., 2016). *GA2-oxidase* (*GA2ox*) genes, which encode the enzymes responsible for the deactivation of bioactive GA₄ and GA₁, are upregulated during dormancy and dormancy release in Japanese apricot buds (Yamane et al., 2008) but during ecodormancy as well in Japanese pear (Bai et al., 2013). Thus it appears that GAs regulation is tightly balanced between production and degradation, and they might enhance growth rate when the conditions are favorable. Interestingly, endogenous ROS application enhances endogenous GA concentration in *Arabidopsis* seed (Bahin et al., 2011) through diminution of its catabolism, and conversely GA₄ application in apricot flower buds led to the development of oxidative stress and subsequent dormancy release (Zhuang et al., 2013). Thus there is obviously a tight link between ROS and GA, both influencing each other.

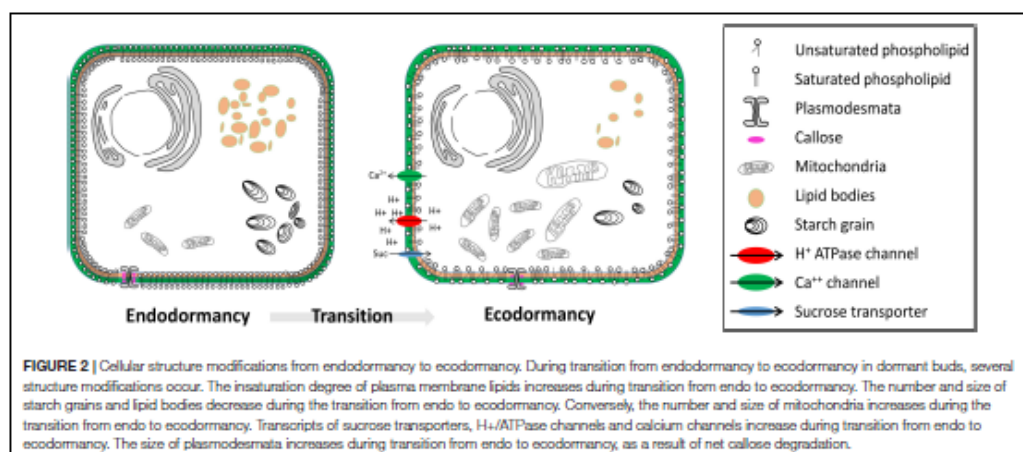
Taken as a whole, we can postulate that, similarly to seed dormancy, the hormonal balance between ABA and GA, which promotes dormancy and growth, respectively, may mediate the decision toward bud break, and as stated previously for different hormonal studies. Furthermore, as shown for the interaction between ethylene and ABA, ethylene modulating ABA degradation and signaling (Zheng et al., 2015), all hormonal

pathways are interconnected and act together to control dormancy progression this balance may be directly influenced by ROS content, notably through redox control of the activity and symplasmic and apoplastic transport of plant growth regulator or transcriptions factors (Considine and Considine, 2016).

PLASMA MEMBRANE AND CELL WALL MODIFICATIONS

On another scale, modifications of membrane structure may be influenced by ROS concentration, or may be responsible for changing metabolism and thus may enhance ROS production. For example, O₂ diffusion through membranes may be more effective just before endodormancy release, inducing metabolism activity and then the increase of ROS production. On the other hand, as proposed above, ROS production may be caused by hypoxia. It is therefore essential to understand whether membrane modifications induce ROS production by raising metabolism as oxygen is more available, or if oxygen shortage generates ROS (Turrens, 2003). Molecular and metabolic changes associated with seasonal cycle of dormancy have been studied extensively in trees but structural changes at the cell level were less examined. Cells are organized in different compartments that enable their normal functioning. These compartments are delimited by membranes that are bilayers of complex lipids, partly permeable, associated with proteins (Figure 2). The stability of the membranes under cold stress highly depends on their functional and structural characteristics therefore the role of its components, lipids and proteins, is crucial. During winter, both dormancy and cold acclimation modify the cell structure and the two processes are usually difficult to separate. The lipid composition and membranous factors are modified during dormancy, notably to protect the cells from freezing-induced dehydration and lesions (Wang and Faust, 1990; Uemura and Steponkus, 1999). For example, it has been shown that the fluidity of the plasma membranes of bud cells in peach increases with chilling during dormancy release (Portrat et al., 1995), associated with a marked increase in total phospholipid content and in the relative level of linolenic acid (C18:3) (Erez et al., 1997). Moreover, low temperatures or thidiazuron, a growth regulator, increases the degree of unsaturation of fatty acids in the membrane lipids of apple buds, changes the polar head group composition, and changes sterol levels and composition (Wang and Faust, 1988, 1990). In addition, triggering dormancy release by GA₄ application further confirmed that the composition in linoleic and linolenic acids are modified during dormancy progression (Zhuang et al., 2015).

Thus, winter cold temperatures lead to modifications in the membrane state as part of the cold acclimation process but also potentially the dormancy state. Nevertheless, no studies have been undertaken concerning the global lipid composition during the dormancy period with a lack of chilling, thus allowing a better understanding of the role of lipids over winter and spring rest. Studies investigating ultrastructure changes during dormancy are still rare but exceptions includes: plasmodesmata and lipid droplets analyses (Rinne and van der Schoot, 2004;



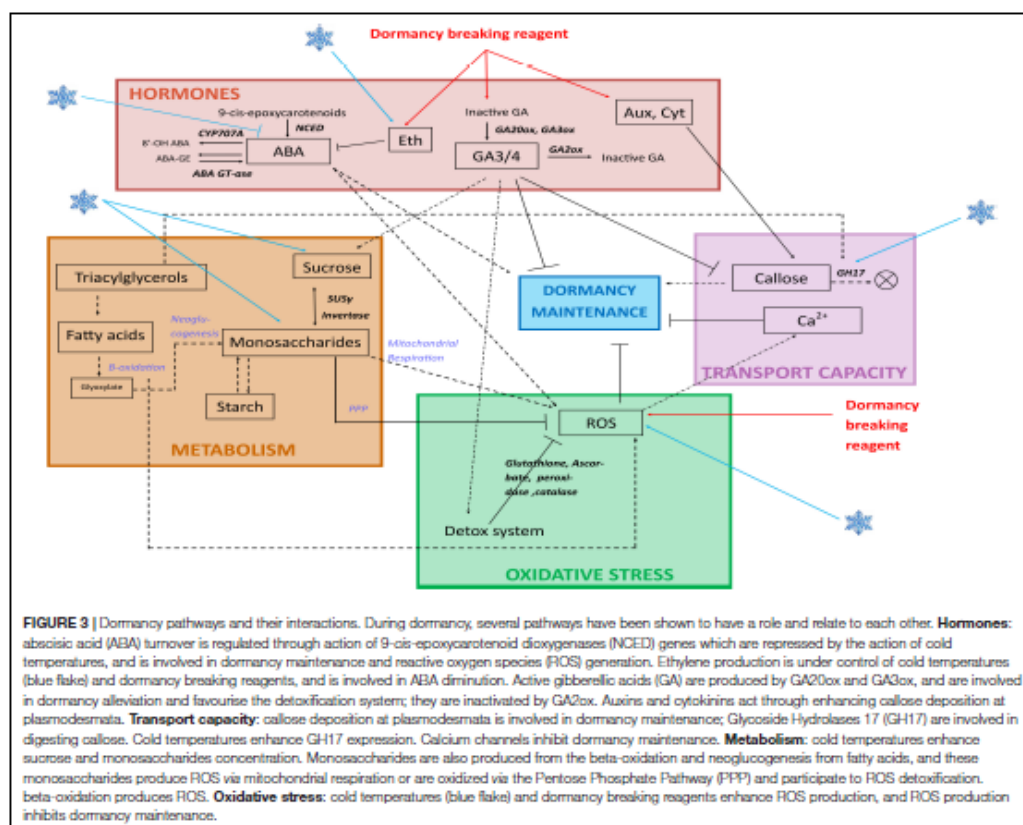
Rinne et al., 2011; Paul et al., 2014) and cell wall thickening and an increase in vacuole precipitates during dormancy induction (Jian et al., 1997). Currently, no study has shown a direct relationship between ROS signaling and membrane modification in bud dormancy but analyses on seed germination have shown that hydroxyl radical $OH\cdot$ had a direct role on degradation involved in cell wall loosening (Müller et al., 2009). Therefore, we can hypothesize that ROS signaling may be involved in downstream cell wall loosening during bud dormancy release and growth resumption.

ROLE OF MEMBRANE BOUND TRANSPORTERS

Apart from the changes in the saturation level of the lipids and types of lipids, other properties of the membranes are modified over dormancy progression (Figure 2). In particular, movements through the plasma membrane and long-distance transport change in response to chilling. In peach for example, active absorption of sucrose and other nutrients is stopped when the bud is in a state of deep dormancy while an active sucrose import was observed during growth resumption (Marquat et al., 1996). These modifications in cotransport H^+ /sucrose can be explained by structural changes of the plasma membrane (Wisniewski and Ashworth, 1986; Portrat et al., 1995), and more specifically by changes in ATPases activity (Giaquinta, 1979) (Figure 2). Plasma membrane H^+ extrusion pumps (PM H^+ ATPases) are key players in transport activity through their role in energizing solute transport (Alves et al., 2001) and studies revealed that H^+ ATPases accumulation and activity are inhibited during endodormancy (Aue et al., 2000) but increase during endodormancy release or ecodormancy in peach (Gévaudant et al., 2001), walnut (Alves et al., 2007), and pear (Liu et al., 2012) (Figure 2). In the same time, the hydric status of buds varies characteristically with a marked dehydration in

endodormancy and a water content increase in ecodormancy, just before budburst (Rinne et al., 1994; Yooyongwech et al., 2009; Götz et al., 2014; Kaufmann and Blanke, 2017). Water content was reported to increase in peach buds after a treatment with HC, a dormancy-breaking agent, suggesting that not only cold regulates the hydric status (Yooyongwech et al., 2012). The water status in buds is controlled by a range of membrane bound channels like aquaporins. Transcripts for two aquaporins showed differential spatiotemporal patterns in dormant peach buds in an interesting study by Yooyongwech et al. (2008). Their observations revealed that the activation of inter- and intra-cell communication through aquaporins resulted in a gradual increase in water content before growth resumption, which occurs earlier in low-chill cultivars than in high-chill cultivars.

Furthermore, connections between cells and organs over dormancy progression rely on the plasmodesmata functioning for carbohydrate and nutrient supply as well as signaling molecules. Plasmodesmata are not only essential for cell-to-cell transport, thus crucial for the bud functioning during dormancy, but they also control the supply route through the phloem between the buds and the shoot. Consequently, modifications of the transport activity by obstruction of the plasmodesmata system lead to growth cessation, dormancy onset and dormancy release (Rinne and van der Schoot, 1998; Rinne et al., 2001; Xu et al., 2016). In their exhaustive review on plasmodesmata, Rinne and van der Schoot (2003) demonstrated the key role of plasmodesmata activity for symplasmic uncoupling and recoupling of vegetative bud cells during dormancy onset and dormancy release, respectively. In dormancy-inducing conditions, several studies have shown that callose (1,3- β -D-glucan) is deposited at the bottleneck region of plasmodesmata leading to diminished, if not stopped, transport and signaling between cells (Rinne et al., 2001). Net callose deposition is governed by the joint action of 1,3- β -glucansynthases and 1,3- β -glucanases (glucan hydrolase family 17, GH17), and shifts in



the balance of these enzymes are central to the dormancy status and the growth potential of buds. Rinne et al. (2001, 2011) have hypothesized that the balance shifted toward net deposition as long as endodormancy lasts. Subsequently, during chilling-induced dormancy release, blocked plasmodesmata connections are restored within the bud by callose degradation. GAs seem to be implicated in the up-regulation of specific 1,3- β -glucanases involved in orchestrating the chilling-induced callose breakdown to restore symplastic connections after endodormancy release (Rinne et al., 2011). By focusing on the ultra-structure of plasmodesmata Rinne et al. (2001) have shown that lipid bodies are targeted to the plasma membrane in close proximity to the plasmodesmata and may facilitate the restoration of plasmodesmata functionality (Rinne et al., 2011). Lipid droplets are membrane-bound storage organelles of universal occurrence. Recent analyses have suggested their role as signaling platforms that deliver proteins and signaling molecules (Murphy, 2012). In plants, they have been described as globules containing neutral lipids, triglycerides (TAG) or sterol esters, delimited by a phospholipid monolayer (Farese and Walther, 2009; Chapman

et al., 2012). van der Schoot et al. (2011) and Paul et al. (2014) have hypothesized that in buds, lipid bodies function as a vehicle that delivers proteins to the plasmodesmata, including 1,3- β -glucanases to the callose deposits in order to restore plasmodesmata function (Rinne et al., 2011). Overall, explaining the establishment and release of dormancy by the dynamics of callose and plasmodesmata is tempting but genetic and molecular evidence to support this hypothesis are still lacking and causality remains unproven. Recently, observations on spruce embryonic shoots have revealed that callose was still detected in plasmodesmata during ecodormancy (Guzicka et al., 2017). Furthermore, recent studies on architecture and permeability of plasmodesmata have shed light on the fine mechanisms regulating cell-to-cell connectivity. They show that, although callose is a central regulator of plasmodesmata, it does not necessarily mediate all changes to connectivity and to the size exclusion limit (SEL) for the molecules (Tilsner et al., 2016; Nicolas et al., 2017).

To our knowledge, no published study has uncovered interactions between ROS signaling and intercellular transport

during bud dormancy. However, these links have been firmly suggested in other systems. For example, *Nicotiana benthamiana* mutants exhibiting increased production of ROS also displayed higher plasmodesmal transport (Stonebloom et al., 2012). In *Arabidopsis*, a study measuring root cell permeability also supports the hypothesis that ROS amounts regulate plasmodesmata function: application of low concentrations of H_2O_2 increased plasmodesmata permeability whereas high H_2O_2 concentrations induced plasmodesmata closure (Rutschow et al., 2011). These results suggest that ROS may participate in promoting the formation and alteration of plasmodesmata, or callose deposit, thus controlling communication and transport. Rutschow et al. (2011) speculate that this signaling is linked to differential stress response: low amounts of ROS indicate mild stresses that might be mitigated by increased cellular transport while the response to extreme stresses revealed by acute ROS signals necessitates cellular isolation. For bud tissues, the question here is therefore which amount of ROS is produced during dormancy progression and release and how this signal is transduced for cellular transport.

CONCLUSION

Oxidative stress, carbohydrates metabolism highly linked to the mitochondrial respiration, hormones and transport capacity associated to plasma membrane and cell wall properties have been shown to play important roles in bud dormancy process. As these pathways interact between them, dormancy mechanism is very complex. The main pathways involved in bud dormancy are synthesized in Figure 3. Overall, these studies highlight the pivotal role of ROS production and detoxification systems for dormancy release. As a consequence of a combination of stresses

and the decrease of cell metabolism, dormant buds accumulate ROS and their removal by scavenging and detoxification systems seems to be associated with breaking of dormancy. Implication of these mechanisms is further validated by the action of HC, potentially linked to the generation of sub-lethal oxidation stress. The question remains whether slow accumulation of ROS, as a consequence of winter temperatures and low metabolism, triggers dormancy release when a sub-lethal threshold is reached, or a prompt shift into stress-inducible conditions leads to a dormancy-alleviating response. In this case, the whole concept of chilling requirements could be questioned. Further studies are necessary to address these hypotheses, including the question of toxicity of dormancy-breaking treatments, in relation to ROS production.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RB, BW, and ED designed the manuscript. RB and BW wrote the manuscript. BW and ED critically evaluated the manuscript.

FUNDING

This work was supported by INRA and Aquitaine Region (AQUIPRU project 2014-1R20102-2971) for financing doctoral fellowships to RB.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank INRA and the Aquitaine Region for finding the financing doctoral fellowships to RB.

REFERENCES

- Aloni, R., Baum, S. F., and Peterson, C. A. (1990). The role of cytokinin in sieve tube regeneration and callose production in wounded coleus internodes 1. *Plant Physiol.* 93, 982–989. doi: 10.1071/PP9930601
- Alves, G., Améglio, T., Guillot, A., Julien, J. L., Pétel, G., and Fleurat-Lessard, P. (2001). Cytological and immunological approach of vessel-associated cells in understanding the winter sugar exchanges, in walnut stems. *Acta Hort.* 544, 295–300. doi: 10.17660/ActaHortic.2001.544.38
- Alves, G., Decourteix, M., Fleurat-Lessard, P., Sakr, S., Bonhomme, M., Améglio, T., et al. (2007). Spatial activity and expression of plasma membrane H^+ -ATPase in stem xylem of walnut during dormancy and growth resumption. *Tree Physiol.* 27, 1471–1480. doi: 10.1093/treephys/27.10.1471
- Amooaghaie, R., and Ahmadi, F. (2017). Triangular interplay between ROS, ABA and GA in dormancy alleviation of *Bunium persicum* seeds by cold stratification. *Russ. J. Plant Physiol.* 64, 588–599. doi: 10.1134/S1021443717040021
- Anderson, J. V., Horvath, D. P., Chao, W. S., and Foley, M. E. (2010). "Bud dormancy in perennial plants: a mechanism for survival," in *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, eds E. Lubzens, J. Cerda, and M. Clark (Berlin: Springer), 69–90. doi: 10.1007/978-3-642-12422-8_5
- Arc, E., Galland, M., Cuff, G., Godin, B., Lounif, L., Job, D., et al. (2011). Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: how quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. *Proteomics* 11, 1606–1618. doi: 10.1002/pmic.201000641
- Aue, H.-L., Lecomte, I., and Pétel, G. (2000). Changes in parameters of the plasmalemma ATPase during peach vegetative bud dormancy. *Biol. Plant.* 43, 25–29. doi: 10.1023/A:1026538526649
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbiseau, F., and Leymarie, J. (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 34, 980–993. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x
- Bai, S., Saito, T., Sakamoto, D., Fujii, H., and Moriguchi, T. (2013). Transcriptome analysis of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) flower buds transitioning through endodormancy. *Plant Cell Physiol.* 54, 1132–1151. doi: 10.1093/pcp/ptc067
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., et al. (2010). Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environ.* 33, 981–994. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02120.x
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 49883–49888. doi: 10.1074/jbc.M408918200
- Bartolini, S., Vitagliano, C., Cinelli, F., and Scalabrelli, G. (1996). Effect of hydrogen cyanamide on apricot bud break and catalase activity. *Acta Hort.* 441, 159–166.
- Bartolini, S., Zanol, G. C., and Viti, R. (2006). Changes in antioxidant compounds in flower buds of two apricot cultivars during winter season. *Acta Hort.* 701, 69–74. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.701.7

- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Fan, S., Reighard, G. L., Scorza, R., and Abbott, A. G. (2004). A deletion affecting several gene candidates is present in the evergrowing peach mutant. *J. Hered.* 95, 436–444. doi: 10.1093/jhered/esh057
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. L., et al. (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 Genet. Genomes* 4, 495–507. doi: 10.1007/s11295-007-0126-9
- Bohlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., et al. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312, 1040–1043. doi: 10.1126/science.1126038
- Bonhomme, M., Rageau, R., and Gendraud, M. (2000). Influence of temperature on the dynamics of ATP, ADP and non-adenylic triphosphate nucleotides in vegetative and floral peach buds during dormancy. *Tree Physiol.* 20, 615–621. doi: 10.1093/treephys/20.9.615
- Brown, D., Griggs, W., and Iwakiri, B. (1960). The influence of gibberellin on resting pear buds. *Proc. Am. Soc. Hortic.* 76, 52–58.
- Chao, W. S., Dogramaci, M., Horvath, D. P., Anderson, J. V., and Foley, M. E. (2017). Comparison of phytohormone levels and transcript profiles during seasonal dormancy transitions in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Mol. Biol.* 94, 281–302. doi: 10.1007/s11103-017-0607-7
- Chapman, E., Wright, L. C., and Raison, J. K. (1979). Seasonal changes in the structure and function of mitochondrial membranes of arctic tubers. *Plant Physiol.* 63, 363–366. doi: 10.1104/pp.63.2.363
- Chapman, K. D., Dyer, J. M., and Mullens, R. T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. *J. Lipid Res.* 53, 215–226. doi: 10.1194/jlr.R021436
- Charrier, G., Chuine, I., Bonhomme, M., and Ameglio, T. (2017). Assessing frost damages using dynamic models in walnut trees: exposure rather than vulnerability controls frost risks. *Plant Cell Environ.* 41, 1008–1021. doi: 10.1111/pce.12935
- Considine, M. J., and Considine, J. A. (2016). On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 3189–3203. doi: 10.1093/jxb/erw138
- Considine, M. J., Diaz-Vivancos, P., Kerchev, P., Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Gibbs, D. J., et al. (2017). Learning to breathe: developmental phase transitions in oxygen status. *Trends Plant Sci.* 22, 140–153. doi: 10.1016/j.tplants.2016.11.013
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326. doi: 10.1089/ars.2013.5665
- Cooke, J. E., Eriksson, M. E., and Junttila, O. (2012). The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ.* 35, 1707–1728. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x
- Davies, D. R., Bindscheller, L. V., Strickland, T. S., and Bolwell, G. P. (2006). Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *J. Exp. Bot.* 57, 1817–1827. doi: 10.1093/jxb/erj216
- Davies, P. J. (2013). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Del Cueto, J., Ionescu, I. A., Pičmanová, M., Gericke, O., Motawia, M. S., Olsen, C. E., et al. (2017). Cyanogenic glucosides and derivatives in almond and sweet cherry flower buds from dormancy to flowering. *Front. Plant Sci.* 8:800. doi: 10.3389/fpls.2017.00800
- Dieuouide, M., Brouquisse, R., Pradet, A., and Raymond, P. (1992). Increased Fatty Acid β -Oxidation after glucose starvation in maize root tips. *Plant Physiol.* 99, 595–600. doi: 10.1104/pp.99.2.595
- Dogramaci, M., Foley, M. E., Chao, W. S., Christoffers, M. J., and Anderson, J. V. (2013). Induction of endodormancy in crown buds of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) implicates a role for ethylene and cross-talk between photoperiod and temperature. *Plant Mol. Biol.* 81, 577–593. doi: 10.1007/s11103-013-0026-3
- Einat, A., and Valizadeh, J. (2017). Storage reserve mobilization, gluconeogenesis, and oxidative pattern in dormant pistachio (*Pistacia vera* L.) seeds during cold stratification. *Trees* 31, 659–671. doi: 10.1007/s00468-016-1498-y
- El Kayal, W., Allen, C. C., Ju, C. J., Adams, E., King-Jones, S., Zaharia, I. I., et al. (2011). Molecular events of apical bud formation in white spruce *Picea glauca*. *Plant Cell Environ.* 34, 480–500. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02257.x
- El-Sherief, A. R., Mizutani, F., Ongaso, J. M., and Sharif Hossain, A. B. M. (2006). Influence of different temperatures on bud break and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of young peach trees. *Acta Physiol. Plant.* 28, 459–463. doi: 10.1007/BF02706629
- Erex, A., Wang, S. Y., and Faust, M. (1997). Lipids in peach buds during dormancy, a possible involvement in dormancy control. *Adv. Hortic. Sci.* 11, 128–132.
- Farese, R. V., and Walther, T. C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855–860. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.005
- Felker, F. C., Robitaille, H. A., and Hess, F. D. (1983). Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds. *Am. J. Bot.* 70, 376–386. doi: 10.2307/2443246
- Fennell, A. Y., Schlauch, K. A., Gouthu, S., Deluc, L. G., Khadka, V., Sreekantan, L., et al. (2015). Short day transcriptomic programming during induction of dormancy in grapevine. *Funct. Plant Ecol.* 6:834. doi: 10.3389/fpls.2015.00834
- Gévaudan, F., Pétel, G., and Guillot, A. (2001). Differential expression of four members of the H⁺-ATPase gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. *Planta* 212, 619–626. doi: 10.1007/s004250000438
- Giaquinta, R. T. (1979). Phloem Loading of Sucrose. *Plant Physiol.* 63, 744–748. doi: 10.1104/pp.63.4.744
- Götz, K.-P., Chmielewski, F.-M., Homann, T., Huschek, G., Matzner, P., and Rawel, H. M. (2014). Seasonal changes of physiological parameters in sweet cherry (*Prunus avium* L.) buds. *Sci. Hortic.* 172, 183–190. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.012
- Guak, S., and Fuchigami, L. H. (2001). Effects of applied ABA on growth cessation, bud dormancy, cold acclimation, leaf senescence and N mobilization in apple nursery plants. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 459–464. doi: 10.1080/14620316.2001.11511394
- Guzicka, M. (2001). Changes in starch distribution within an embryonic shoot of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] before resumption of mitotic activity. *Dendrobiology* 46, 27–31.
- Guzicka, M., Pawłowski, T. A., Staszak, A., Rożkowski, R., and Chmura, D. J. (2017). Molecular and structural changes in vegetative buds of Norway spruce during dormancy in natural weather conditions. *Tree Physiol.* doi: 10.1093/treephys/tpx156 [Epub ahead of print].
- Halaly, T., Pang, X., Batkoff, T., Crane, O., Keren, A., Venkateswari, J., et al. (2008). Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* 228, 79–88. doi: 10.1007/s00425-008-0720-6
- Hao, X., Chao, W., Yang, Y., and Horvath, D. (2015). Coordinated expression of FLOWERING LOCUS T and DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX-Like genes in Leafy Spurge. *PLoS One* 10:e0126030. doi: 10.1371/journal.pone.0126030
- Hao, X., Yang, Y., Yue, C., Wang, L., Horvath, D. P., and Wang, X. (2017). Comprehensive transcriptome analyses reveal differential gene expression profiles of *Camellia sinensis* axillary buds at para-, endo-, ecodormancy, and bud flush stages. *Front. Plant Sci.* 8:553. doi: 10.3389/fpls.2017.00553
- Horvath, D. P., Chao, W. S., Suttle, J. C., Thimmapuram, J., and Anderson, J. V. (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. doi: 10.1186/1471-2164-9-536
- Howe, G. T., Horvath, D. P., Dharmawardhana, P., Priest, H. D., Mockler, T. C., and Strauss, S. H. (2015). Extensive transcriptome changes during natural onset and release of vegetative bud dormancy in *Populus*. *Funct. Plant Ecol.* 6:989. doi: 10.3389/fpls.2015.00989
- Hsu, C.-Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., et al. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10756–10761. doi: 10.1073/pnas.1104713108
- Huang, X., Zhu, W., Dai, S., Gai, S., Zheng, G., and Zheng, C. (2008). The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Planta* 228, 545–552. doi: 10.1007/s00425-008-0757-6
- Hussain, S., Niu, Q., Yang, F., Hussain, N., and Teng, Y. (2015). The possible role of chilling in floral and vegetative bud dormancy release in *Pyrus pyrifolia*. *Biol. Plant.* 59, 726–734. doi: 10.1007/s10535-015-0547-5
- Ionescu, I. A., López-Ortega, G., Burrow, M., Bayo-Cañha, A., Junge, A., Gericke, O., et al. (2017). Transcriptome and metabolite changes during

- hydrogen cyanamide-induced floral bud break in sweet cherry. *Front. Plant Sci.* 8:1233. doi: 10.3389/fpls.2017.01233
- Jian, L., Li, P. H., Sun, L., and Chen, T. H. (1997). Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca²⁺ in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J. Exp. Bot.* 48, 1195–1207. doi: 10.1093/jxb/48.6.1195
- Jiménez, S., Reighard, G. L., and Bielenberg, D. G. (2010). Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Mol. Biol.* 73, 157–167. doi: 10.1007/s11103-010-9608-5
- Kaufmann, H., and Blanke, M. (2017). Changes in carbohydrate levels and relative water content (RWC) to distinguish dormancy phases in sweet cherry. *J. Plant Physiol.* 218, 1–5. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.004
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* 21, 829–837. doi: 10.1007/s00299-003-0591-z
- Kocay, G., von Ballmoos, P., Rüeggsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., and Brunold, C. (2001). Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol.* 127, 1147–1156. doi: 10.1104/pp.010107
- Koussa, T., Broquedis, M., and Bouard, J. (1994). Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la phase de levée de dormance. *Vitis* 33, 63–67.
- Kuroda, H., Sugiura, T., and Ito, D. (2002). Changes in hydrogen peroxide content in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in relation to breaking of endodormancy. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 71, 610–616. doi: 10.2503/jjshs.71.610
- Kuroda, H., Sugiura, T., and Sugiura, H. (2005). Effect of Hydrogen peroxide on breaking endodormancy in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 74, 255–257. doi: 10.2503/jjshs.74.255
- Lang, G., Early, J., Martin, G., and Darnell, R. (1987). Endo-, para-, and eodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience* 22:377.
- Le Bris, M., Michaux-Ferrière, N., Jacob, Y., Poupet, A., Barthe, P., Guignon, J.-M., et al. (1999). Regulation of bud dormancy by manipulation of ABA in isolated buds of *Rosa hybrida* cultured in vitro. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 273–281. doi: 10.1071/PP98133
- Leida, C., Conejero, A., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2012). Chilling-Dependent release of seed and bud dormancy in peach associates to common changes in gene expression. *PLoS One* 7:e35777. doi: 10.1371/journal.pone.0035777
- Leida, C., Terol, J., Martí, G., Agustí, M., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2010). Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiol.* 30, 655–666. doi: 10.1093/treephys/tpq008
- Li, J., Xu, Y., Niu, Q., He, L., Teng, Y., and Bai, S. (2018). Abscissic Acid (ABA) promotes the induction and maintenance of Pear (*Pyrus pyrifolia* White Pear Group) flower bud endodormancy. *Int. J. Mol. Sci.* 19:E310. doi: 10.3390/ijms19010310
- Li, Z., Reighard, G. L., Abbott, A. G., and Bielenberg, D. G. (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, 3521–3530. doi: 10.1093/jxb/erp195
- Liu, B., Zhang, N., Wen, Y., Jin, X., Yang, J., Si, H., et al. (2015). Transcriptomic changes during tuber dormancy release process revealed by RNA sequencing in potato. *J. Biotechnol.* 198, 17–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.019
- Liu, B., Zhao, S., Tan, F., Zhao, H., Wang, D., Si, H., et al. (2017). Changes in ROS production and antioxidant capacity during tuber sprouting in potato. *Food Chem.* 237, 205–213. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.107
- Liu, G., Li, W., Zheng, P., Xu, T., Chen, L., Liu, D., et al. (2012). Transcriptomic analysis of 'Suli' pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) buds during the dormancy by RNA-Seq. *BMC Genomics* 13:700. doi: 10.1186/1471-2164-13-700
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., and Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61, 2979–2990. doi: 10.1093/jxb/erq125
- Luna, V., Lorenzo, E., Reinoso, H., Tordable, M. C., Abdala, G., Pharis, R. P., et al. (1990). Dormancy in Peach (*Prunus persica* L.) flower buds: I. Floral morphogenesis and endogenous gibberellins at the end of the dormancy period. *Plant Physiol.* 93, 20–25. doi: 10.1104/pp.93.1.20
- Marquart, C., Petel, G., and Gendraud, M. (1996). Study of H⁺-nutrient co-transport in peach-tree and the approach to their involvement in the expression of vegetative bud growth capability. *J. Plant Physiol.* 149, 102–108. doi: 10.1016/S0176-1617(96)80180-5
- Meinhard, M., and Grill, E. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 508, 443–446. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03106-4
- Meihta, K., Agudelo-Romero, P., Signorelli, S., Gibbs, D. J., Considine, J. A., Foyer, C. H., et al. (2018). Developmental control of hypoxia during bud burst in grapevine. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.13141 [Epub ahead of print].
- Meihta, K., Konnerup, D., Colmer, T. D., Considine, J. A., Foyer, C. H., and Considine, M. J. (2015). Spatio-temporal relief from hypoxia and production of reactive oxygen species during bud burst in grapevine (*Vitis vinifera*). *Ann. Bot.* 116, 703–711. doi: 10.1093/aob/mcv123
- Mielke, E. A., and Dennis, F. G. (1978). Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). III. Effects of leaves, defoliation and temperature on levels of abscisic acid in flower primordia. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 103, 446–449.
- Mimida, N., Saito, T., Moriguchi, T., Suzuki, A., Komori, S., and Wada, M. (2015). Expression of DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)-like genes in apple. *Biol. Plant.* 59, 237–244. doi: 10.1007/s10535-015-0503-4
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoel, K., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R. A., Fry, S. C., Krieger-Liszczay, A., and Leubner-Metzger, G. (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cross seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* 150, 1855–1865. doi: 10.1104/pp.109.139204
- Murcia, G., Pontin, M., Reinoso, H., Baraldi, R., Bertazza, G., Gómez-Talquencia, S., et al. (2015). ABA and GA3 increase carbon allocation in different organs of grapevine plants by inducing accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, enhancement of phloem area and expression of sugar transporters. *Physiol. Plant.* 156, 323–337. doi: 10.1111/pp.12390
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541–585. doi: 10.1007/s00709-011-0329-7
- Nee, C.-C., and Fuchigami, L. H. (1992). Overcoming rest at different growth stages with hydrogen cyanamide. *Sci. Hortic.* 50, 107–113. doi: 10.1016/S0304-4238(05)80013-5
- Nicolas, W. J., Grison, M. S., Trépo, S., Gaston, A., Fouché, M., Cordelières, F. P., et al. (2017). Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nat. Plants* 3:17082. doi: 10.1038/nplants.2017.82
- Oncelay, C. Y., Daley, L. S., Vines, H. M., Couvillon, G. A., and Hendershott, C. H. (1979). Seasonal fluctuation in malate dehydrogenase, phosphatase and proteinase activity of dormant peach flower buds. *Sci. Hortic.* 11, 229–239. doi: 10.1016/0304-4238(79)90004-9
- Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D., et al. (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol. Biol.* 71, 403–423. doi: 10.1007/s11103-009-9531-9
- Or, E., Vilozny, I., Eyal, Y., and Ogrudovitch, A. (2000). The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Mol. Biol.* 43, 483–494. doi: 10.1023/A:1006450516982
- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J. M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., et al. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation: dormancy in sunflower seeds. *Plant J.* 50, 452–465. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.03063.x
- Oracz, K., and Karpinski, S. (2016). Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Front. Plant Sci.* 7:864. doi: 10.3389/fpls.2016.00864
- Orfer, C. J., and Goussard, P. G. (1980). Effect of hot-water treatments on budburst and rooting of grapevine cuttings. *Vitis* 19, 1–3.

- Parada, F., Noriega, X., Dantas, D., Bressan-Smith, R., and Pérez, F. J. (2016). Differences in respiration between dormant and non-dormant buds suggest the involvement of ABA in the development of endodormancy in grapevines. *J. Plant Physiol.* 201, 71–78. doi: 10.1016/j.jplph.2016.07.007
- Park, J.-Y., Canam, T., Kang, K.-Y., Unda, F., and Mansfield, S. D. (2009). Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology. *Tree Physiol.* 29, 937–946. doi: 10.1093/treephys/tpq028
- Paul, L. K., Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2014). Shoot meristems of deciduous woody perennials: self-organization and morphogenetic transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 86–95. doi: 10.1016/j.pbi.2013.11.009
- Pérez, F. J., and Burgos, B. (2004). Alterations in the pattern of peroxidase isoenzymes and transient increases in its activity and in H₂O₂ levels take place during the dormancy cycle of grapevine buds: the effect of hydrogen cyanamide. *Plant Growth Regul.* 43, 213–220. doi: 10.1023/B:GROW.0000046003.33194.ac
- Pérez, F. J., and Lira, W. (2005). Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. *J. Plant Physiol.* 162, 301–308. doi: 10.1016/j.jplph.2004.07.011
- Pérez, F. J., Vergara, R., and Or, E. (2009). On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul.* 59, 145–152. doi: 10.1007/s10725-009-9397-5
- Pérez, F. J., Vergara, R., and Rubio, S. (2008). H₂O₂ is involved in the dormancy-breaking effect of hydrogen cyanamide in grapevine buds. *Plant Growth Regul.* 55, 149–155. doi: 10.1007/s10725-008-9269-4
- Pfeiffer, W., and Hoffberger, M. (2001). Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells. *Physiol. Plant.* 111, 144–150. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110203.x
- Piola, F., Label, P., Vergne, P., Aderkas, P., and von Rohr, R. (1998). Effects of endogenous ABA levels and temperature on cedar (*Cedrus libani* Loudon) bud dormancy in vitro. *Plant Cell Rep.* 18, 279–283. doi: 10.1007/s002990050571
- Porto, D. D., Bruneau, M., Perini, P., Anzanello, R., Renou, J.-P., dos, et al. (2015). Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for FLC-like genes. *J. Exp. Bot.* 66, 2659–2672. doi: 10.1093/jxb/erv061
- Portrat, K., Mathieu, C., Motta, C., and Pétel, G. (1995). Changes in plasma membrane properties of peach tree buds and stands during dormancy. *J. Plant Physiol.* 147, 346–350. doi: 10.1016/S0176-1617(11)82165-6
- Pouget, R. (1965). Action de la chlorpromazine sur la dormance de la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Ann. Physiol. Vég.* 7, 273–282.
- Prassinis, C., Rigas, S., Kizis, D., Vlahou, A., and Hatzopoulos, P. (2011). Subtle proteome differences identified between post-dormant vegetative and floral peach buds. *J. Proteomics* 74, 607–619. doi: 10.1016/j.jpro.2011.01.018
- Ramona, A., Colauzzi, M., Masia, A., Pitacco, A., Caruso, T., Messina, R., et al. (1995). Hormonal and climatological aspects of dormancy in peach buds. *Acta Hort.* 395, 35–46. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.395.3
- Regier, N., Streh, S., Zeeman, S. C., and Frey, B. (2010). Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* × *nigra* cv. Dorakamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. *Tree Physiol.* 30, 979–987. doi: 10.1093/treephys/tpq047
- Reinoso, H., Luna, V., Dauria, C., Pharis, R., and Bottini, R. (2002). Dormancy in peach (*Prunus persica*) flower buds. VI. Effects of gibberellins and an acylcyclohexanediol (trinexapac-ethyl) on bud morphogenesis in field experiments with orchard trees and on cuttings. *Can. J. Bot.* 80, 664–674. doi: 10.1139/B02-051
- Rinne, P., Tuominen, H., and Juntila, O. (1994). Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Betula pubescens*. *Tree Physiol.* 14, 549–561. doi: 10.1093/treephys/14.6.549
- Rinne, P. L., Kaikuranta, P. M., and van der Schoot, C. (2001). The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J.* 26, 249–264. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01022.x
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 125, 1477–1485.
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2003). Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense. *Can. J. Bot.* 81, 1182–1197. doi: 10.1139/b03-123
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2004). Cell-cell communication as a key factor in dormancy cycling. *J. Crop Improv.* 10, 113–156. doi: 10.1300/J411v10n01
- Rinne, P. L., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjärvi, J., et al. (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1, 3-β-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell* 23, 130–146. doi: 10.1105/tpc.110.081307
- Rios, G., Conejero, A., Leida, C., Petri, C., Burgos, L., and Badenes, M. L. (2014). "Functional characterization of a SAP protein expressed in dormant buds of peach," in *Proceedings of the 7th International Rosaceae Genomics Conference*, Washington, DC, 20.
- Rodríguez, A., and Sánchez-Tamés, R. (1986). Dormancy and seasonal changes of plant growth regulators in hazel buds. *Physiol. Plant.* 66, 288–292. doi: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb02422.x
- Rodríguez, A. J., Sherman, W. B., Scorza, R., Wisniewski, M., and Okie, W. R. (1994). Evergreen Peach, its inheritance and dormant behavior. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 789–792.
- Rodríguez-Gacio Mdol, C., Matilla-Vázquez, M. A., and Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal. Behav.* 4, 1035–1048. doi: 10.4161/psb.4.11.9902
- Rohde, A., Ruttink, T., Hostyn, V., Sterck, L., Van Driessche, K., and Boerjan, W. (2007). Gene expression during the induction, maintenance, and release of dormancy in apical buds of poplar. *J. Exp. Bot.* 58, 4047–4060. doi: 10.1093/jxb/erm261
- Rubio, S., Donoso, A., and Pérez, F. J. (2014). The dormancy-breaking stimuli "chilling, hypoxia and cyanamide exposure" up-regulate the expression of α-amylase genes in grapevine buds. *J. Plant Physiol.* 171, 373–381. doi: 10.1016/j.jplph.2013.11.009
- Rutschow, H. L., Baskin, T. L., and Kramer, E. M. (2011). Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. *Plant Physiol.* 155, 1817–1826. doi: 10.1104/pp.110.168.168187
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., et al. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19, 2370–2390. doi: 10.1105/tpc.107.05.2811
- Saito, T., Bai, S., Imai, T., Ito, A., Nakajima, L., and Moriguchi, T. (2015). Histone modification and signalling cascade of the dormancy-associated MADS-box gene, PpMADS13-1, in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) during endodormancy. *Plant Cell Environ.* 38, 1157–1166. doi: 10.1111/pce.12469
- Saito, T., Bai, S., Ito, A., Sakamoto, D., Saito, T., Ubi, B. E., et al. (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 Physiol.* 33, 654–667. doi: 10.1093/treephys/tpi037
- Sanchez-Perez, R., Del Cueto, J., Dicenta, F., and Martinez-Gomez, P. (2014). Recent advancements to study flowering time in almond and other *Prunus* species. *Front. Plant Sci.* 5:334. doi: 10.3389/fpls.2014.00334
- Sasaki, R., Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Kitamura, Y., Akagi, T., et al. (2011). Functional and expression analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiol.* 157, 485–497. doi: 10.1104/pp.111.181982
- Saure, M. C. (1985). "Dormancy release in deciduous fruit trees," in *Horticultural Reviews*, ed. J. Janick (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.), 239–300. doi: 10.1002/9781118060735.ch6
- Scalabrelli, G., Viti, R., and Cinelli, F. (1991). Change in the catalase activity and dormancy of apricot buds in response to chilling. *Acta Hort.* 293, 267–274. doi: 10.17660/ActaHortic.1991.293.31
- Seif El-Yazal, M. A., Seif El-Yazal, S. A., and Rady, M. M. (2014). Exogenous dormancy-breaking substances positively change endogenous phytohormones and amino acids during dormancy release in 'Anna' apple trees. *Plant Growth Regul.* 72, 211–220. doi: 10.1007/s10725-013-9852-1
- Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Meitha, K., Foyer, C. H., and Considine, M. J. (2018). Roles for light, energy, and oxygen in the fate of quiescent axillary buds. *Plant Physiol.* 176, 1171–1181. doi: 10.1104/pp.17.01479
- Siller-Cepeda, J. H., Fuchigami, L. H., and Chen, T. H. (1992). Glutathione content in peach buds in relation to development and release of rest. *Plant Cell Physiol.* 33, 867–872.
- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A., and Scorza, R. (2012). Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar FT1 result in altered architecture,

- dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS One* 7:e40715. doi: 10.1371/journal.pone.0040715
- Stonebloom, S., Brunkard, A., Cheung, A. C., Jiang, K., and Zambryski, P. (2012). Redox states of plastids and mitochondria differentially regulate intercellular transport via plasmodesmata. *Plant Physiol.* 158, 190–199. doi: 10.1104/pp.111.186130
- Sudawan, B., Chang, C.-S., Chao, H. F., Ku, M. S. B., and Yen, Y. (2016). Hydrogen cyanamide breaks grapevine bud dormancy in the summer through transient activation of gene expression and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species. *BMC Plant Biol.* 16:202. doi: 10.1186/s12870-016-0889-y
- Tan, Y., Gao, D.-S., Li, L., Wei, H.-R., Wang, J.-W., and Liu, Q.-Z. (2015). Relationships between H₂O₂ metabolism and Ca²⁺ transport in dormancy-breaking process of nectarine floral buds. *Researchgate* 26, 425–429.
- Tarancon, C., Gonzalez-Grandio, E., Oliveros, J. C., Nicolas, M., and Cubas, P. (2017). A conserved carbon starvation response underlies bud dormancy in woody and Herbaceous Species. *Front. Plant Sci.* 8:788. doi: 10.3389/fpls.2017.00788
- Tilner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E. M. (2016). Staying tight: plasmodesmal membrane contact sites and the control of cell-to-cell connectivity in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 337–364. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015
- Tuan, P. A., Bai, S., Saito, T., Ito, A., and Moriguchi, T. (2017). Dormancy-Associated MADS-Box (DAM) and the abscisic acid pathway regulate pear endodormancy through a feedback mechanism. *Plant Cell Physiol.* 58, 1378–1390. doi: 10.1093/pcp/pcx074
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. doi: 10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x
- Ubi, B. E., Sakamoto, D., Ban, Y., Shimada, T., Ito, A., Nakajima, I., et al. (2010). Molecular cloning of dormancy-associated mads-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese pear. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 174–182.
- Uemura, M., and Steponkus, P. L. (1999). Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J. Plant Res.* 112, 245–254. doi: 10.1007/PL00013882
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., et al. (2009). Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2, 1310–1324. doi: 10.1093/mp/ssp053
- van der Schoot, C., Paul, L. K., Paul, S. B., and Rinne, P. L. (2011). Plant lipid bodies and cell-cell signaling. *Plant Signal. Behav.* 6, 1732–1738. doi: 10.4161/psb.6.11.17639
- Vergara, R., Rubio, S., and Pérez, F. J. (2012). Hypoxia and hydrogen cyanamide induce bud break and up-regulate hypoxic responsive genes (HRG) and VvFT in grapevine-buds. *Plant Mol. Biol.* 79, 171–178. doi: 10.1007/s11103-012-9904-3
- Viti, R., Bartolini, S., and Zanol, G. C. (2012). Biological changes and active oxygen-scavenging enzymes activities in apricot (*Prunus armeniaca* L.) flower buds during dormancy transitions. *Acta Hortic.* 940, 331–339. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.940.47
- Wang, D., Gao, Z., Du, P., Xiao, W., Tan, Q., Chen, X., et al. (2016). Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Crop Sci. Hortic.* 6:1248. doi: 10.3389/fpls.2015.01248
- Wang, M., van der Meulen, R. M., Visser, K., Van Schaik, H. P., Van Duijn, B., and de Boer, A. H. (1998). Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Sci. Res.* 8, 129–137. doi: 10.1017/S0960258500004025
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1988). Changes of fatty acids and sterols in apple buds during bud break induced by a plant bioregulator, thidiazuron. *Physiol. Plant.* 72, 115–120. doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb06631.x
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1990). Changes of membrane lipids in apple buds during dormancy and budbreak. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115, 803–808.
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1994). Changes in polyamine content during dormancy in flower buds of 'Anna'. *Apple. J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 70–73.
- Wang, S. Y., Ji, Z. L., Sun, T., and Faust, M. (1987). Effect of thidiazuron on abscisic acid content in apple bud relative to dormancy. *Physiol. Plant.* 71, 105–109. doi: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04625.x
- Wen, L. H., Zhong, W. J., Huo, X. M., Zhuang, W. B., Ni, Z. J., and Gao, Z. H. (2016). Expression analysis of ABA- and GA-related genes during four stages of bud dormancy in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 91, 362–369. doi: 10.1080/14620316.2016.1160546
- Wisniewski, M., and Ashworth, E. N. (1986). A comparison of seasonal ultrastructural changes in stem tissues of peach (*Prunus persica*) that exhibit contrasting mechanisms of cold hardiness. *Bot. Gaz.* 147, 407–417. doi: 10.1086/337608
- Wisniewski, M., Norelli, J., and Artlip, T. (2015). Overexpression of a peach CBF gene in apple: a model for understanding the integration of growth, dormancy, and cold hardiness in woody plants. *Front. Plant Sci.* 6:85. doi: 10.3389/fpls.2015.00085
- Wu, R., Wang, T., Warren, B. A. W., Allan, A. C., Macknight, R. C., and Varkonyi-Gasic, E. (2017). Kiwifruit SVP2 gene prevents premature budbreak during dormancy. *J. Exp. Bot.* 68, 1071–1082. doi: 10.1093/jxb/erx014
- Xu, H., Cao, D., Chen, Y., Wei, D., Wang, Y., Stevenson, R. A., et al. (2016). Gene expression and proteomic analysis of shoot apical meristem transition from dormancy to activation in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Sci. Rep.* 6:19938. doi: 10.1038/srep19938
- Yamane, H., Kashiwa, Y., Ooka, T., Tao, R., and 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. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133, 708–716.
- Yoooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Chaum, S., et al. (2012). Hydrogen cyanamide enhances MRI-measured water status in flower buds of peach (*Prunus persica* L.) during winter. *Plant Omics* 5, 400–404.
- Yoooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Yamaguchi, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., et al. (2008). Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiol. Plant.* 134, 522–533. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01143.x
- Yoooyongwech, S., Sugaya, S., Sekozawa, Y., and Gemma, H. (2009). Differential adaptation of high- and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content. *Plant Cell Rep.* 28, 1709–1715. doi: 10.1007/s00299-009-0770-7
- Zanol, G. C., Sekozawa, Y., Sugaya, S., and Gemma, H. (2010). The glutathione accumulation on mixed bud tissues during the dormancy of Japanese pear. *Acta Hortic.* 872, 77–84. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.872.7
- Zhang, Y., Sun, T., Liu, S., Dong, L., Liu, C., Song, W., et al. (2016). MYC cis-Elements in PsMPT promoter is involved in chilling response of *Paeonia suffruticosa*. *PLoS One* 11:e0155780. doi: 10.1371/journal.pone.0155780
- Zhang, Y. X., Yu, D., Tian, X. L., Liu, C. Y., Gai, S. P., and Zheng, G. S. (2015). Differential expression proteins associated with bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Biol.* 17, 114–122. doi: 10.1111/plb.12213
- Zheng, C., Halaly, T., Acheampong, A. K., Takebayashi, Y., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., et al. (2015). Abscissic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *J. Exp. Bot.* 66, 1527–1542. doi: 10.1093/jxb/eru519
- Zhong, W., Gao, Z., Zhuang, W., Shi, T., Zhang, Z., and Ni, Z. (2013). Genome-wide expression profiles of seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot. *Plant Mol. Biol.* 83, 247–264. doi: 10.1007/s11103-013-0086-4
- Zhuang, W., Gao, Z., Wang, L., Zhong, W., Ni, Z., and Zhang, Z. (2013). Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA4 in Japanese apricot flower bud dormancy release. *J. Exp. Bot.* 64, 4953–4966. doi: 10.1093/jxb/ert284
- Zhuang, W., Gao, Z., Wen, L., Huo, X., Cai, B., and Zhang, Z. (2015). Metabolic changes upon flower bud break in Japanese apricot are enhanced by exogenous GA4. *Hortic. Res.* 2:15046. doi: 10.1038/hortres.2015.46

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Beauvieux, Wenden and Dirlwanger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2). Comme présenté dans la partie I, la profondeur de dormance peut être évaluée par le pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C après 10 jours de forçage (Tableau 11). Trois groupes ont ainsi été définis (Figure 32a) : groupe 1 (moins de 47 portions de froid), groupe 2 (47-72 portions de froid) et groupe 3 (plus de 72 portions de froid) (Figure 32a). Nous proposons de définir des sous-groupes pour chaque combinaison (date de prélèvement) x (groupe de précocité) caractéristiques de différentes profondeurs de dormance (Figure 32b).

Les échantillons de bourgeons prélevés sur les 54 variétés ont donc été combinés en sous-groupes sur lesquels l'ABA a été dosé (Figure 32c). La quantité d'ABA est élevée dans les bourgeons en dormance très profonde (ENDO ; P1, P2 et P3) tandis qu'elle est plus faible pour les bourgeons autour de la levée de dormance (LD ; P4 et P5), ce qui confirmerait que l'ABA est impliqué dans le maintien de la dormance. De façon surprenante, on observe qu'il y a une augmentation des quantités d'ABA en écodormance (P6 et P7) puis une forte diminution d'ABA en fin d'écodormance/début de floraison (P8).

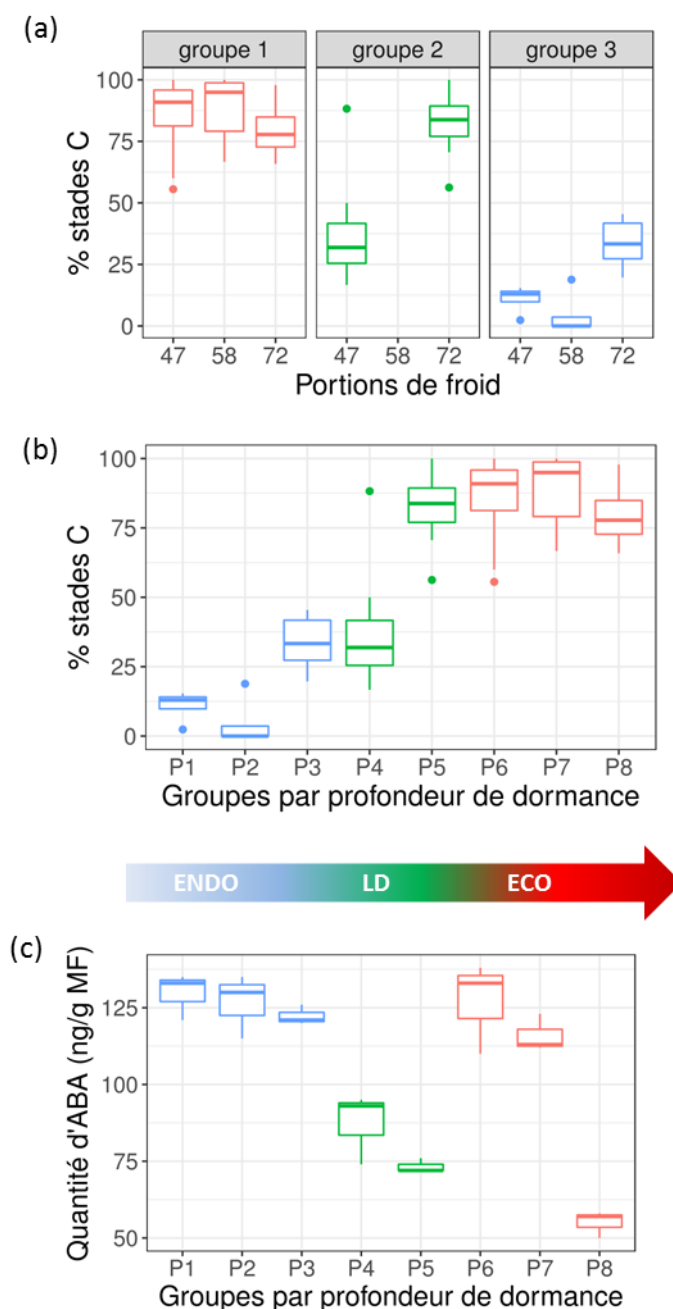


Figure 32 : Dosage de l'ABA en fonction du statut de dormance

Des groupes d'individus ont été constitués après des prélèvements sur 55 individus soumis au forçage de rameaux à 3 dates du 15 janvier 2015 au 16 février 2015 (47 portions de froid, 58 portions de froid et 72 portions de froid) (a). Le groupe 1 est constitué d'individus déjà sortis de dormance dès le premier prélèvement, le groupe 2 est constitué d'individus en dormance

au premier prélèvement et sortis de dormance au dernier prélèvement et le groupe 3 est constitué d'individus en dormance du premier au dernier prélèvement (a). Des pools, sur la base du pourcentage de débourrement et du groupe de précocité ont pu être constitués : ceux-ci correspondent à la profondeur de dormance, avec en bleu les individus en endodormance (ENDO), en vert les individus en levée de dormance (LD) et en rouge les individus en écodormance (ECO) (b). La quantité d'ABA en ng/g matière fraîche a été déterminée dans chacun des pools en fonction de la profondeur de dormance (c).

III.4 Expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'acide abscissique au cours de la dormance

Pour mieux comprendre la dynamique d'ABA au cours de la dormance, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ABA a été étudiée depuis juillet jusqu'à la floraison chez deux variétés contrastées pour leur besoins en froid : faibles besoins ('Cristobalina') et forts besoins ('Regina') (Figure 33). Au cours de la dormance, trois gènes *NCED*, dans la biosynthèse de l'ABA, sont différenciellement exprimés avec des profils très différents. *NCED5* est fortement exprimé entre septembre et décembre, en accord avec la quantité d'ABA observée en endodormance, et qui confirmerait le rôle de l'ABA dans l'entrée et le maintien de la dormance. Toutefois, la diminution de l'expression de *NCED5* est synchronisée pour les deux variétés en décembre, ce qui suggère plutôt un déterminisme environnemental. L'expression du gène *NCED3* est très intéressante puisqu'elle est relativement constitutive jusqu'à la levée de dormance lorsqu'elle diminue de façon drastique. On peut donc faire l'hypothèse que *NCED5* est impliqué dans la production d'ABA pour le contrôle de l'entrée en dormance tandis que *NCED3* induit une production d'ABA nécessaire au maintien de la dormance. De façon générale, on observe une réponse globale à l'ABA vers décembre, avec une augmentation marquée de l'expression de *PYL8*, qui est un récepteur d'ABA, du gène *ABF2*, qui est activé par l'ABA, et de *CYP707A2*, qui est impliqué dans la dégradation de l'ABA. En fin d'écodormance, l'expression des trois gènes *NCED* augmente chez 'Cristobalina', ce qui pourrait conduire à une hausse marquée de la quantité d'ABA, telle qu'observé pour l'écodormance (Figure 32c, sous-groupes P6 et P7).

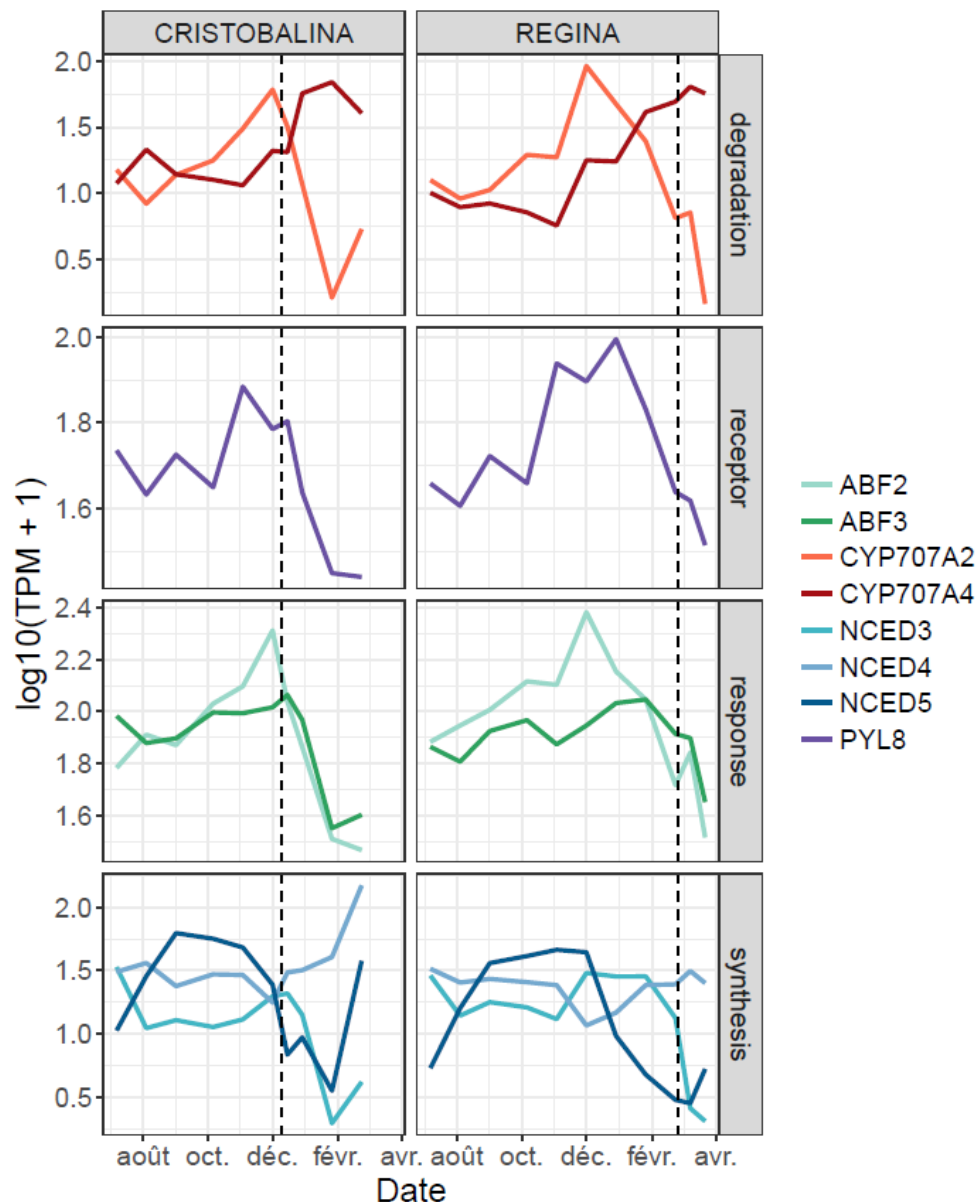


Figure 33 : Profil d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ABA.

Les niveaux d'expression ont été quantifiés par RNA-seq à partir de bourgeons floraux de cerisiers depuis juillet 2015 jusqu'à la floraison 2016 chez 2 variétés contrastées pour leurs besoins en froid : très faibles ('Cristobalina') et forts besoins en froid ('Regina'). Les valeurs sont centrées réduites et la catégorie à laquelle appartiennent les gènes est indiquée dans le cadre à droite dégradation (CYP707A)/ récepteur (PYL8)/ réponse (ABF)/ synthèse (NCED). La date ou l'intervalle de la levée de dormance est indiqué par les lignes verticales pointillées.

Les résultats confirment le rôle de l'ABA dans l'induction et le maintien de la dormance. La cinétique de la quantité d'ABA en fonction de la profondeur de dormance semble cohérente avec les résultats de dosage d'ABA au cours de la dormance obtenus chez la variété 'Summit' (Götz et al., 2014). Ces travaux mettent en évidence un pic de la quantité d'ABA correspondant à l'entrée en dormance puis une chute, et un deuxième pic précédant la floraison. Ainsi dans ces conditions l'ABA semble synthétisé principalement pendant la dormance et également pendant l'écodormance, avec une chute correspondant à la levée de l'endodormance. Une forte quantité d'ABA est corrélée à toutes les périodes sans croissance

ni développement. Le gène *NCED5* semble avoir un rôle prépondérant dans ce contrôle avec une expression fortement activée en endodormance (Figure 33 : Profil d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ABA.), de façon similaire à ce qui a déjà été observé chez la vigne et le pêcher (Fennell et al., 2015 ; Wang et al., 2015). On peut penser que la diminution de l'ABA est un signal de levée de l'endodormance, comme le suggère la croissance accélérée observée après application de fluridone sur les rameaux floraux. Le rôle de l'ABA est cependant complexe d'autant plus que sa concentration peut avoir différents effets. En effet, chez la graine d'*Arabidopsis*, des quantités élevées d'ABA inhibent la biosynthèse de GA, qui sont des hormones promotrices de croissance (Liu et al., 2010). Ainsi, cette chute brutale aurait des conséquences non pas sur une croissance visible mais sur une activation de la production de GA, qui semble confirmé par les profils d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des GA (Figure 30). Le modèle d'un rapport ABA/GA orientant soit vers la dormance soit vers la germination, décrit chez la graine, pourrait donc être appliqué aux bourgeons floraux de cerisiers (Finkelstein et al., 2008 ; Koornneef et al., 2002). Dans ce cas, la resynthèse d'ABA lors de l'écodormance peut s'expliquer par la nécessité de conserver un rapport ABA/GA défavorable à la croissance afin de ne pas exposer les bourgeons à des températures encore trop faibles durant la nuit. Ainsi, les risques de dégâts de gel sur des bourgeons en croissance seraient limités. Il semble probable que le contrôle de ce ratio soit environnemental, avec des températures chaudes favorables à la synthèse de GA et à la dégradation d'ABA, tandis que les températures faibles favoriseraient la synthèse d'ABA et la dégradation des GA. Au cours de l'écodormance, l'alternance de températures chaudes (jour) et de températures froides (nuit) entraîne des variations du rapport ABA/GA. Afin de vérifier l'effet de ce rapport sur la capacité de réponse aux températures chaudes, des prélèvements de rameaux pourraient être réalisés la nuit aux heures les plus froides et le jour pendant les heures les plus chaudes. Cette hypothèse (effet du rapport ABA/GA) semble cohérente avec les résultats obtenus après traitement à l'ABA et à la fluridone (inhibiteur de la synthèse d'ABA) (Figure 31). En effet on observe un retard dans le débourrement des bourgeons traités avec l'ABA comparé à ceux traités à la fluridone. Ainsi, on peut penser qu'en effet le ratio ABA/GA est un facteur qui contrôle la croissance, mais pas la capacité de croissance, et donc pas l'endodormance. Ces interactions d'hormones résulteraient de mécanismes mis en œuvre au préalable. Ces derniers pourraient être liés à un stress oxydatif intervenant dans de nombreux mécanismes, notamment sur les hormones, la réponse au stress, la réponse aux pathogènes, la germination etc. (Considine and Foyer, 2014 ; Diaz-Vivancos et al., 2013 ; El-Maarouf-Bouteau et Bailly, 2008 ; Lehmann et al., 2015 ; Liu et al., 2010).

IV. Stress oxydatif

IV.1. Effet d'un traitement par H_2O_2 sur la levée de dormance au cours du temps

Le stress oxydatif est un phénomène résultant de l'accumulation anormale d'espèces réactives de l'oxygène ou 'Reactive Oxygen Species' (ROS). Les ROS sont des molécules rendues très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés, comme par exemple le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée - H_2O_2), le radical superoxyde (O_2^-), les radicaux peroxydes (ROO^\cdot), etc. En conditions physiologiques chez les organismes aérobies, une production de ces ROS est normale, et la cellule dispose de nombreux systèmes de détoxification afin que ces derniers ne s'accumulent pas.

L'étude de l'effet de H_2O_2 , appliqué à des bourgeons floraux de deux variétés contrastées ('Cristobalina' et 'Regina'), avait pour objectif de savoir si, d'une part, un stress oxydatif peut avoir un effet sur la levée de dormance et, d'autre part, si le système de détoxification est sollicité de manière différente en fonction de la période (de juillet à la floraison). De même, l'effet du sodium pyruvate, classiquement utilisé comme source d'énergie mais ayant un effet protecteur vis-à-vis de H_2O_2 a été testé. De plus, nous avons étudié le rôle du glutathion, antioxydant puissant. Les deux formes du glutathion ont été quantifiées, forme oxydée (GSSG) ou réduite (GSH), composantes importantes du système de détoxification.

Nous avons enfin étudié l'expression de gènes impliqués dans la détoxification de ces échantillons.

Des rameaux de la variété 'Fertard' ont été prélevés et sont laissés à tremper dans une solution de H_2O_2 ou de pyruvate de sodium et mis en forçage directement, après 7 jours ou 35 jours en conditions naturelles (Figure 34).

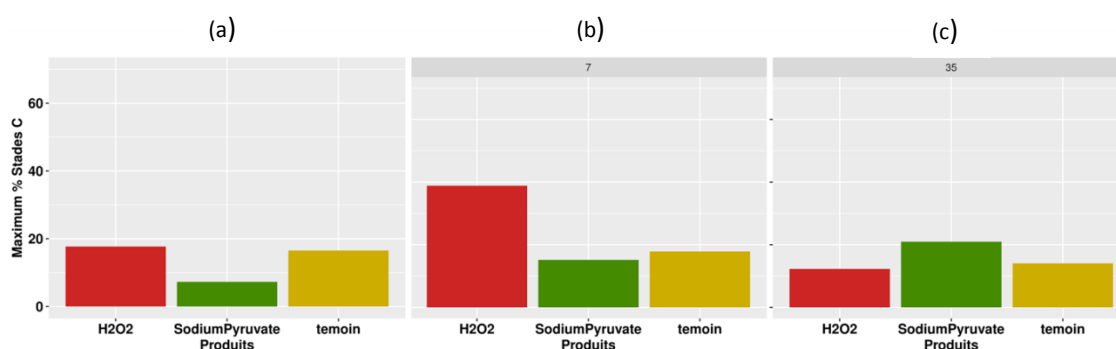


Figure 34 : Effet de l'application du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du pyruvate de sodium sur les bourgeons floraux de cerisier mis en forçage directement (a), après 7 jours (b) ou 35 jours (c) en conditions naturelles.

On observe que le pyruvate de sodium entraine une diminution du pourcentage de bourgeons ayant atteint le stade C lorsque les rameaux sont directement placés en condition de forçage, alors que le peroxyde d'hydrogène ne semble pas avoir d'effet (Figure 34a). Le lot rentré 7 jours après avoir laissé tremper les rameaux dans la solution de peroxyde d'hydrogène montre un pourcentage de débourrement doublé par rapport aux deux autres traitements, le pyruvate de sodium et le témoin (Figure 34b). Il est intéressant de noter que les bourgeons du lot témoin présentent la même réponse au chaud que les bourgeons du lot témoin ayant été placés directement en condition de forçage. Enfin, on observe qu'après 35 jours en conditions naturelles, le pyruvate de sodium provoque un pourcentage de débourrement supérieur au témoin et au peroxyde d'hydrogène (Figure 34c). Le témoin a une légère baisse du pourcentage de débourrement par rapport à 0 jours et 7 jours après traitement. Le peroxyde d'hydrogène est le traitement qui entraine la plus forte diminution par rapport à 0 jours et 7 jours en conditions naturelles après traitement. A notre connaissance, l'effet de l'apport exogène de peroxyde d'hydrogène sur la levée de dormance et le débourrement n'avait jamais été testé sur arbres fruitiers. Cependant, le dosage de ce composé a déjà été effectué sur des bourgeons de poirier japonais (Kuroda) au cours de la période hivernale et montre un profil proche des résultats obtenus pour le saccharose et le sorbitol. Nous avons testé ici l'effet de l' H_2O_2 comme molécule signal, il pourrait être intéressant de doser ce composé et d'évaluer la capacité anti-oxydante de la cellule (Ghiassi Tarzi et al., 2012).

IV.2 Dosage du glutathion -rapport forme réduite/oxydée (GSH/GSSG)

Le glutathion est une molécule formée de 3 acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Comme mentionné précédemment, c'est une molécule clé du potentiel redox du cytoplasme de la cellule, ainsi que pour la détoxification des ROS. Le glutathion a été dosé de juillet jusqu'à la floraison dans des bourgeons floraux de deux variétés contrastées pour leur besoins en froid ('Cristobalina' et 'Regina') (Figure 35).

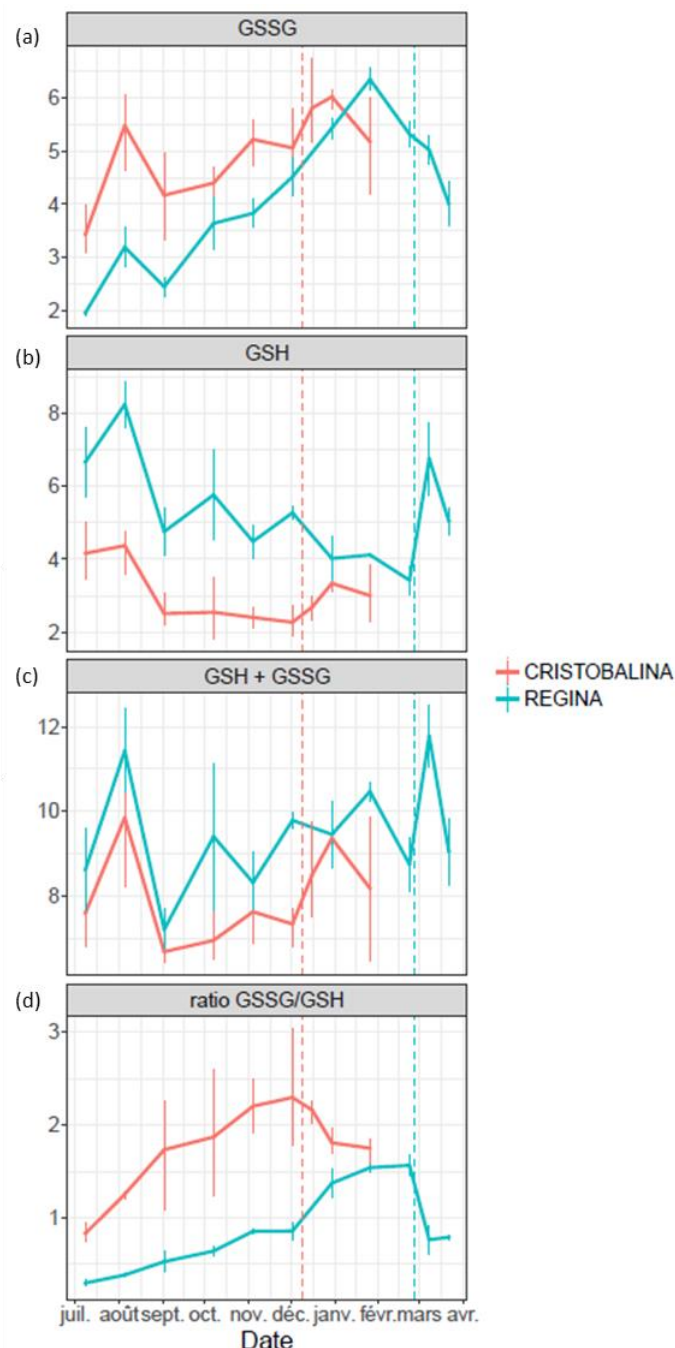


Figure 35 : Dosage du glutathion (a) sous forme oxydée (GSSG), (b) sous forme réduite (GSH), (c) la somme GSSG+GSH, (d) ainsi que le ratio GSSG/GSH dans des bourgeons floraux de cerisier depuis juillet jusqu'à la floraison chez 2 variétés contrastées pour leurs besoins en froid : très faibles ('Cristobalina') et forts ('Regina')

On observe pour les deux variétés un profil similaire de l'évolution du glutathion oxydé (GSSG) (Figure 35a). Ce profil se caractérise par une augmentation globale de juillet jusqu'à la levée de dormance estimée pour 'Cristobalina', et par la même augmentation suivie d'une diminution qui se produit avant la levée de dormance pour 'Regina'. Les quantités de GSSG sont plus élevées chez 'Cristobalina' que chez 'Regina' pour toutes les dates aux stades de dormance comparables. On note aussi pour les deux variétés une augmentation en août puis une diminution. Les deux variétés ont un profil similaire pour l'évolution du glutathion réduit (GSH) (Figure 35b). Ce profil montre une diminution globale depuis juillet puis une

augmentation, juste avant la levée de dormance pour ‘Cristobalina’ et correspondant avec la levée de dormance pour ‘Regina’ (de la même manière que pour le GSSG, on note une légère augmentation du GSH en août). Les valeurs de GSH de la variété ‘Cristobalina’ sont inférieures à celles de la variété ‘Regina’ pour tous les points de prélèvement. La somme du GSH et GSSG présente un profil semblable pour les deux variétés avec une forte augmentation au mois d’août puis une forte diminution, puis une hausse globale qui s’accroît juste après la levée de dormance (Figure 35c). Pour chaque date de prélèvement, la quantité totale de glutathion est supérieure pour ‘Regina’. Le ratio GSSG/GSH est présenté pour les deux variétés (Figure 35d). Le profil est le même pour les deux variétés, avec une augmentation puis une diminution. La diminution a lieu juste avant la levée de dormance estimée pour ‘Cristobalina’ et au moment de la levée de dormance pour ‘Regina’. Le ratio GSSG/GSH est plus élevé pour ‘Cristobalina’ que pour ‘Regina’ pour tous les prélèvements. Ce rapport double, passant de 1 à 2 de juillet à la levée de dormance pour ‘Cristobalina’ et de 0,5 à 1,5 pour ‘Regina’. Ce rapport est très intéressant car signifie qu’il y a proportionnellement plus de GSH que de GSSG jusqu’à décembre pour ‘Regina’ (la variété tardive) et plus de GSSG que de GSH dès le mois d’août pour ‘Cristobalina’ (la variété précoce).

IV.3 Gènes impliqués dans la détoxification

De nombreux gènes codent pour des protéines impliquées dans la détoxification de la cellule. Les superoxydes dismutases permettent de transformer l’ion superoxyde (O_2^-) en H_2O_2 . Le H_2O_2 est réduit par plusieurs enzymes : soit directement par les catalases, soit par les peroxydases. Les peroxydases utilisent le pouvoir réducteur d’une molécule, le GSH dans le cas des glutathion peroxydases, pour réduire le H_2O_2 , et qui induisent une augmentation du GSSG. Le pool de GSSG est recyclé par les glutathions réductases en utilisant le pouvoir réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Figure 36).

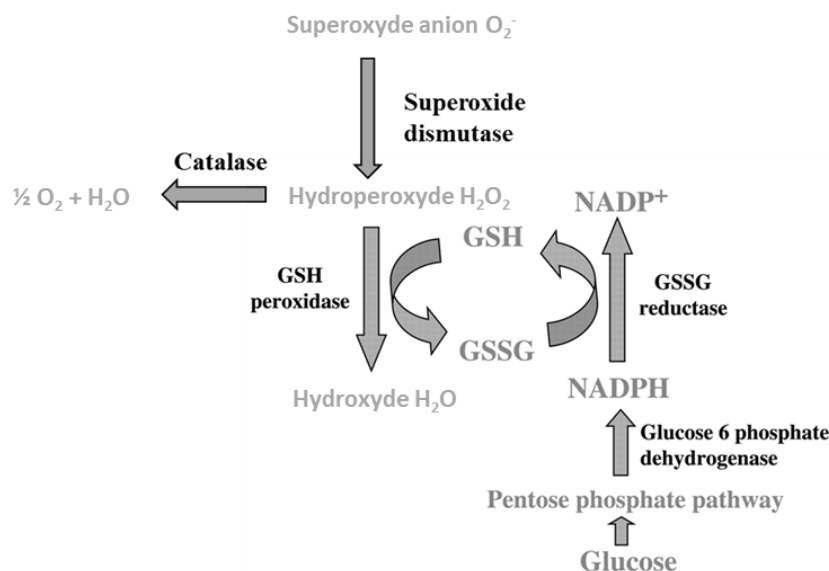


Figure 36 : Voies de détoxification du H₂O₂ (hydroperoxyde) et de l'anion superoxyde (superoxide anion)

Les glutathion-S-transférases sont impliquées dans la conjugaison avec une molécule xénobiotique, permettant son « élimination ». La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est la première enzyme de la voie des pentoses phosphates (PPP), qui fournit le pouvoir réducteur sous forme de NADPH pour les réactions de détoxification. Les gènes codant pour des glutathion réductase (GR) glutathion peroxydase (GPX), glutathion-S-transférases (GST) et G6PD, différenciellement exprimés au cours du cycle, sont présentés pour 'Cristobalina' et 'Regina' en Figure 37. Les glutathion peroxydases ont été séparées en deux groupes pour une meilleure lisibilité sur la base de leur profil général. Le groupe 1 présente globalement une diminution puis une augmentation à partir de la levée de dormance estimée pour 'Cristobalina', et pour 'Regina' une augmentation avec un pic au moment de la levée de dormance. Pour les deux variétés, il y a une chute par la suite. Le groupe 2 présente un profil en cloche, avec une augmentation puis une diminution. Dans le cas de 'Cristobalina', le pic coïncide avec la levée de dormance, mais est très antérieur à la levée de dormance chez 'Regina'. Les glutathion-S-transférases ont un profil très similaire aux glutathion peroxydases du groupe 2, montrant un pic à la levée de dormance pour 'Cristobalina', mais très antérieur à la levée de dormance chez 'Regina'. Les glutathion réductases montrent une stabilité jusqu'au mois de novembre pour les deux variétés, puis une augmentation suivie d'un pic coïncidant avec la levée de dormance pour chaque variété. La G6PD a un profil qui montre une stagnation jusqu'à la levée de dormance puis une forte diminution pour 'Cristobalina', alors qu'elle montre une augmentation puis une diminution antérieure à la levée de dormance chez 'Regina'.

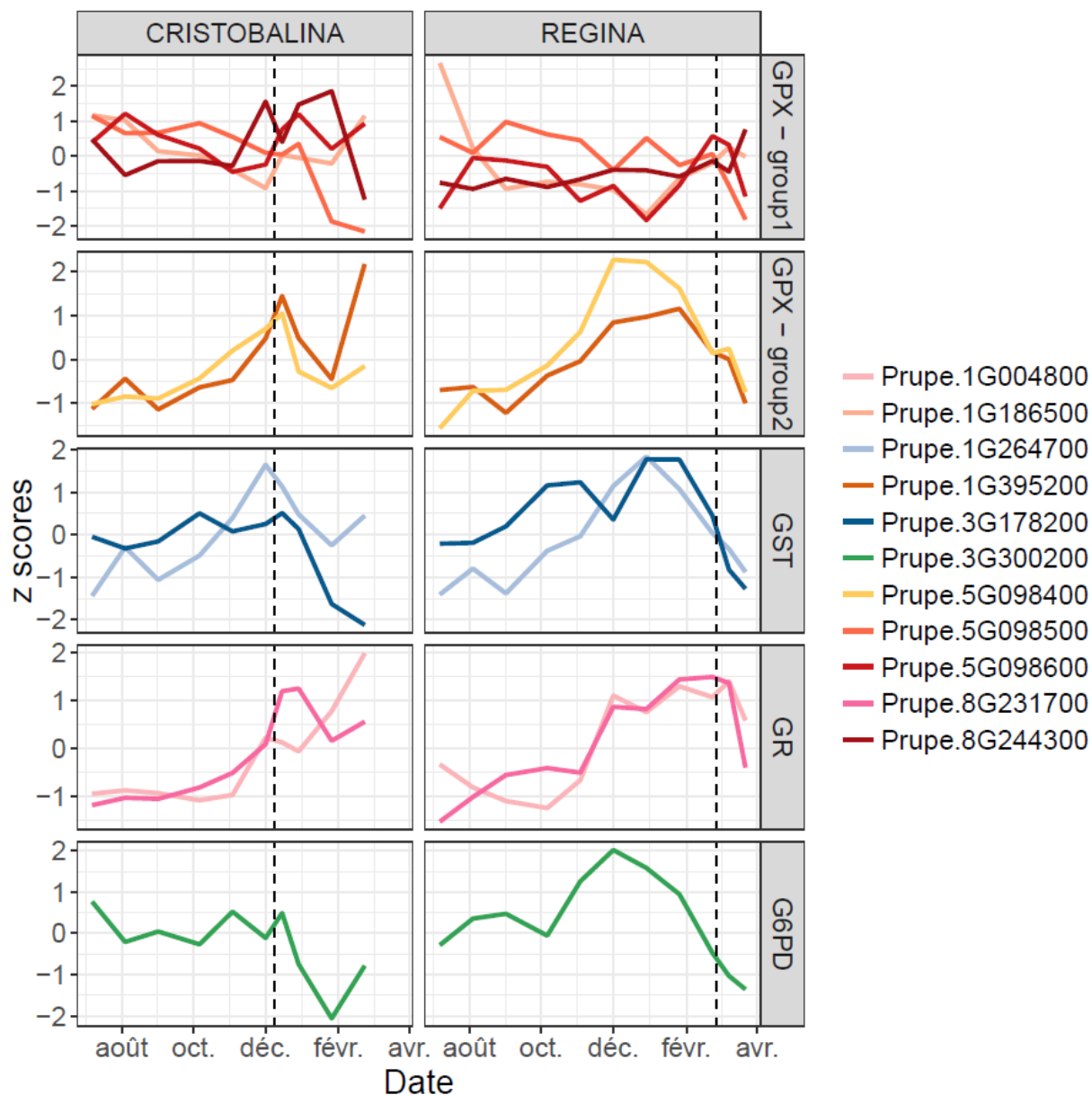


Figure 37 : Etude du niveau d'expression de gènes liés au métabolisme du glutathion chez deux variétés contrastées pour leurs besoins en froid (base *P.persica*).

Les gènes différentiellement exprimés au cours du cycle, chez 'Cristobalina' et 'Regina' codant des catalases et des superoxide dismutases sont présentés en Figure 38.

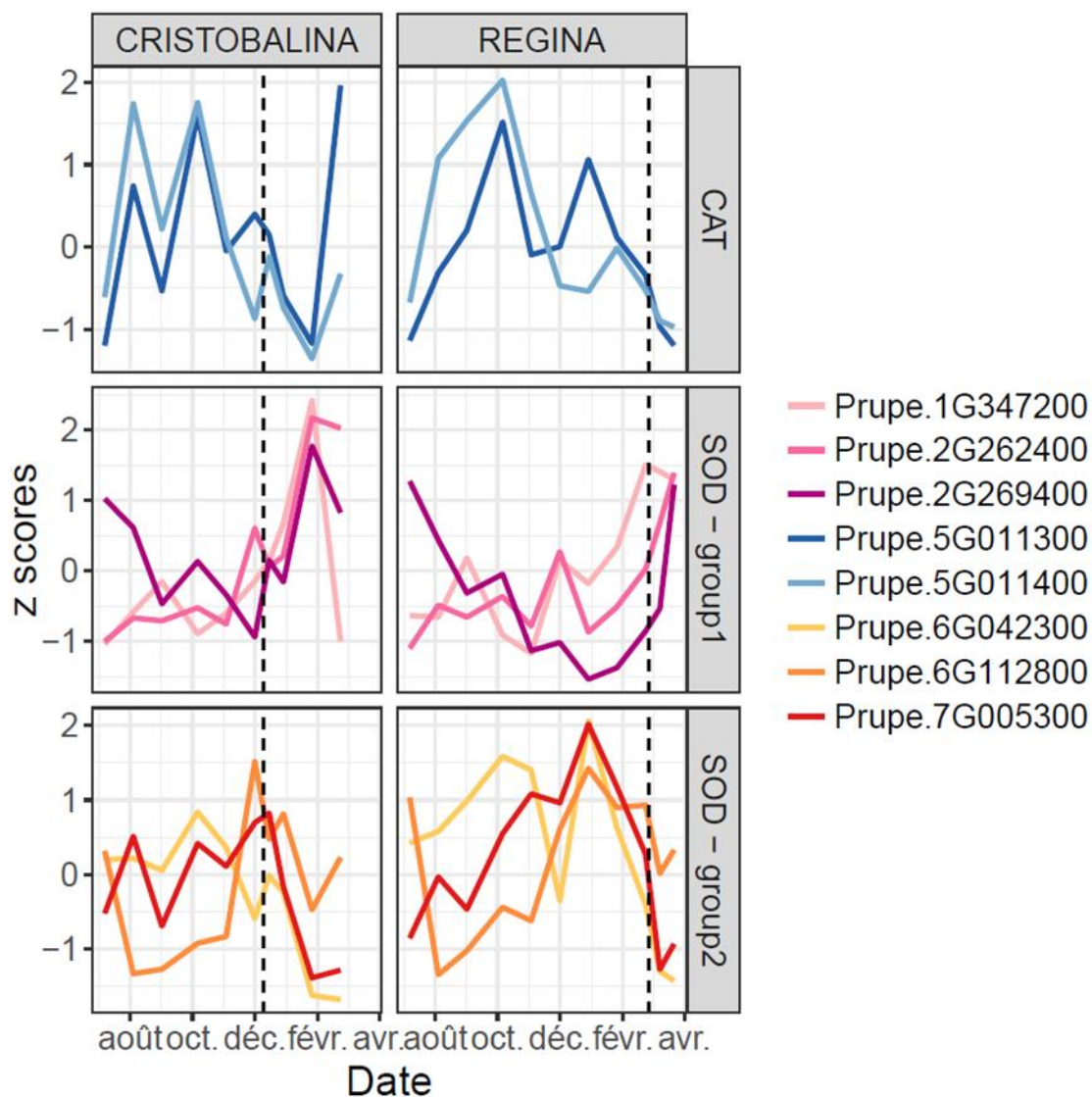


Figure 38 : Etude du niveau d'expression de gènes liés à la détoxification du H_2O_2 et de l'anion superoxyde chez deux variétés contrastées pour leurs besoins en froid.

On observe pour 'Cristobalina' que les catalases subissent une diminution très forte avant et après la levée de dormance, puis une très forte augmentation. Dans le cas de 'Regina', les catalases ont un premier pic en octobre, puis un deuxième pic aux environs de fin décembre puis diminuent jusqu'à la levée de dormance et après. Les superoxydes dismutases ont été séparées en deux groupes distincts en fonction du profil qu'elles présentaient. Le groupe 1 de SOD présente globalement une diminution jusqu'en décembre pour les deux variétés, puis une forte augmentation, correspondant à la levée de dormance pour 'Cristobalina' mais antérieure à la levée de dormance pour 'Regina'. Pour le groupe 2, les SOD montrent globalement une légère augmentation jusqu'en novembre pour 'Cristobalina', et plus marquée chez 'Regina'. On observe un pic, correspondant à la levée de dormance chez 'Cristobalina', mais antérieur à celle-ci chez 'Regina'.

IV.4 Gènes potentiellement impliqués dans la production de ROS

La production de H_2O_2 peut avoir de nombreuses origines. Une des premières sources de production de ROS au sein de la cellule est la mitochondrie, et plus particulièrement la chaîne de respiration mitochondriale (Turrens, 2003). Les différents composants de la membrane mitochondriale impliqués dans la respiration sont schématiquement représentés dans la Figure 39. Les complexes indiqués dans cette figure sont des complexes de la chaîne de transport mitochondriale. Les complexes I, II, III, l'ubiquinone et l'alternative oxidase (AOX) sont les sites producteurs de O_2 . Le stress oxydatif est observé lorsque le système fonctionne beaucoup.

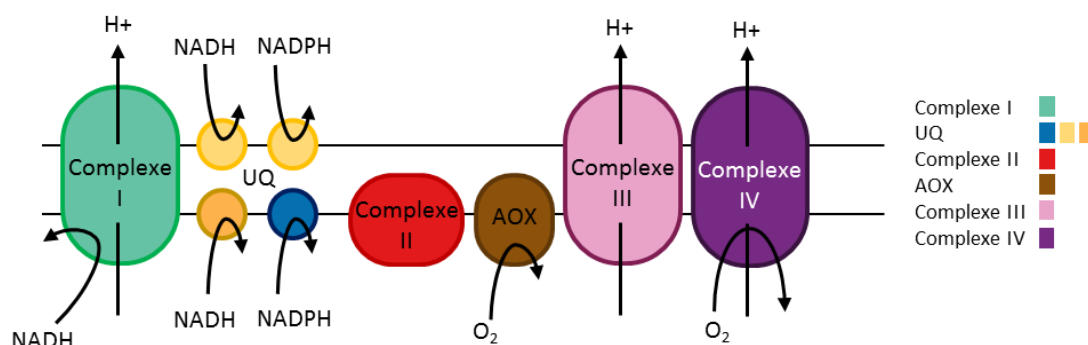


Figure 39 : Composants de la membrane mitochondriale impliqués dans la respiration

Les gènes différentiellement exprimés sont regroupés par classes pour la variété 'Cristobalina' (heatmap) (Figure 40). On observe trois groupes principaux de gènes impliqués dans la chaîne de respiration mitochondriale différentiellement exprimés. Le premier groupe «mauve» montre des gènes principalement exprimés pendant l'été et dont l'expression décline pendant la période de dormance, puis qui sont à nouveau exprimés après la dormance. Le deuxième groupe «rouge» représente les gènes dont l'expression montre un pic vers le mois de décembre à la période de levée de dormance de 'Cristobalina' mais avant ce stade chez 'Regina'. Le dernier groupe «bleu» montre les gènes fortement exprimés en ecodormance pour les deux variétés. Notons dans ce groupe un pic pour les deux variétés au mois de décembre.

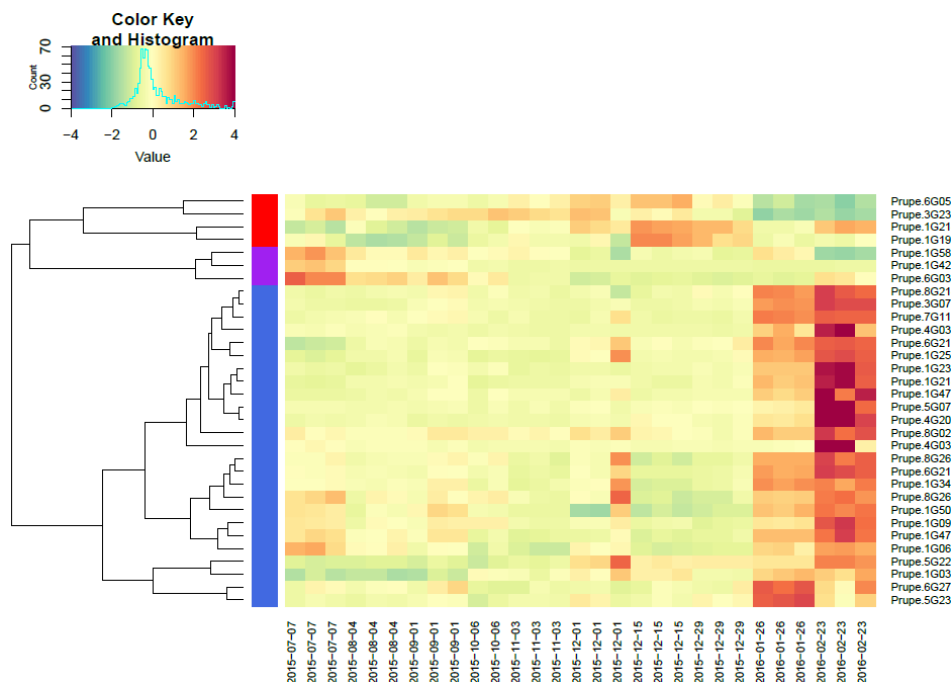


Figure 40 : Heatmap des gènes différentiellement exprimés pour la variété 'Cristobalina'

Enfin, la Figure 41 présente l'expression de gènes impliqués dans la chaîne de respiration en fonction du temps chez 'Cristobalina' et 'Regina'.

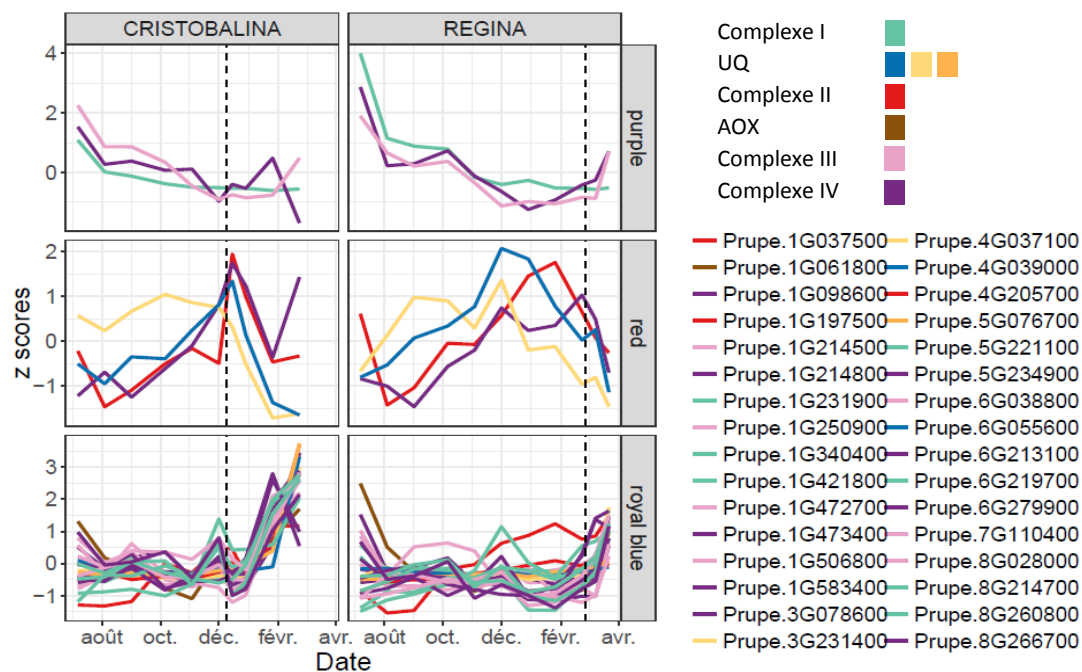


Figure 41 : Expression des gènes impliqués dans la chaîne de respiration en fonction du temps chez 'Cristobalina' et 'Regina'

Il a été montré chez de nombreuses espèces qu'un stress, quel qu'il soit, a un effet sur la levée de dormance. Ce stress peut être d'origine variée, mécanique, chimique, thermique ou encore lié à des maladies. Ce qui est commun à toutes ces observations est bien un stress oxydatif transitoire, qui déclenche une série de réactions. Nous avons vu que le H_2O_2 a un effet sur le débourrement floral, et cet effet est maximal après 7 jours dans des conditions normales avant mise en conditions de forçage ; inversement, le traitement avec un protecteur de H_2O_2 retarde la capacité de réponse au chaud. Ainsi, ce résultat semble aller dans le sens d'un signal du H_2O_2 permettant une réponse aux températures chaudes, cohérent avec de nombreuses études sur la graine (Liu et al., 2010 ; Oracz et al., 2009). Ces résultats sont proches de ceux observés pour la fluridone et les GA, ce qui est en accord avec les résultats obtenus chez le blé et *Arabidopsis* où H_2O_2 favorise la synthèse des GA et le catabolisme de l'ABA (Bahin et al., 2011 ; Liu et al., 2010). Les teneurs en GSSG et le rapport GSSG/GSH présentés en Figure 35a et Figure 35c respectivement pour la variété tardive 'Regina' (plus proche de la variété 'Fertard' utilisée pour le test d'application de H_2O_2), montrent une accumulation de GSSG et ce depuis le début des prélèvements, ce qui semble indiquer une oxydation continue du GSH jusqu'à la levée de dormance. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse qu'il y a une constante augmentation de l'état oxydé jusqu'à un seuil à, partir duquel l'organisation des réponses se met en place. De plus, le rapport GSSG/GSH semble indiquer que tout au long du cycle, la variété précoce est dans un état plus oxydé que réduit alors que pour la variété tardive ce serait l'inverse. On peut se demander si la variété tardive a des capacités de détoxification plus performantes que la variété précoce, et ainsi se maintient plus facilement en-dessous du seuil, ou si elle a une activité de production de ROS moins élevée. La variété tardive possède peut-être aussi un seuil de tolérance au stress oxydatif plus élevé que la variété précoce. L'expression des gènes codant pour GPX, GR et GST montre chez 'Cristobalina' une forte augmentation avant la levée de dormance puis une diminution (Figure 35), ce qui semble indiquer un état de stress qui est cohérent avec le rapport GSSG/GSH observé. Le ratio diminue après la levée de dormance mais reste dans un état oxydé ($GSSG/GSH > 1$). Pour 'Regina', les pics d'expression des GPX groupe 2, GST et G6PD se situent aux alentours du mois de décembre, bien avant la levée de dormance. Ces augmentations coïncident avec les variations du ratio GSSG/GSH, très brutale. Ce ratio est inférieur à 1 jusqu'à fin décembre puis augmente jusqu'à la levée de dormance avant de diminuer brutalement. Ainsi, on peut penser que les conditions du milieu en hiver créent un stress oxydatif, qui est suffisant dès le mois de décembre pour provoquer la levée de dormance chez 'Cristobalina', mais pas chez 'Regina'. Il semble ainsi que le système de détoxification soit plus efficace chez 'Regina'. Notons que les catalases, impliquées dans la détoxification, voient leur expression diminuer

au cours du temps, ce qui a déjà été décrit à de nombreuses reprises notamment pour leur activité globale comme décrit amplement dans la littérature (Bajji et al., 2007 ; Bartolini et al., 1996 ; Hendricks et Taylorson, 1975 ; Wang et al., 1991). Il est étonnant de voir un des systèmes impliqués dans la détoxification s'effondrer à ce moment clé. On peut imaginer que face à un stress modéré, les catalases constituent un système satisfaisant au début du stress puis le glutathion prend la relève. Il est à noter aussi qu'en plus du système de détoxification enzymatique, de nombreuses molécules antioxydantes ont des rôles très importants. C'est le cas notamment des acides chlorogéniques, de l'acide-phénol et de la catéchine obtenus par RMN du proton (Amaki et al., 2011 ; Codignola et al., 1988 ; Zhu et al., 2004). En effet, le groupe des variétés en dormance contient des teneurs plus élevées de ces puissants antioxydants que le groupe des variétés en écodormance.

Si le système antioxydant semble avoir une réelle implication dans les mécanismes de levée de dormance, la question qui se pose est de savoir d'où provient ce stress oxydatif. Comme souligné précédemment, une des premières sources de production de ROS au sein de la cellule est la mitochondrie. Une production excessive de ROS provient d'un déséquilibre : respiration trop rapide ou blocage et réduction incomplète de O₂. Un des moyens de provoquer artificiellement le blocage de la chaîne est le cyanure, qui bloque le complexe IV. Ainsi, l'utilisation de cyanamide d'hydrogène, un produit provoquant la levée de dormance a pour caractéristiques de causer un arrêt de la chaîne respiratoire et une production de ROS. Toutefois, les résultats d'expression de gènes impliqués dans la chaîne respiratoire obtenus ne permettent pas de conclure. On peut néanmoins noter que, pour les deux variétés, de nombreux gènes ont un pic d'expression en décembre qui pourrait être imputable à une réponse à l'environnement. L'excès de ROS pourrait aussi provenir d'autres voies métaboliques, notamment le catabolisme de lipides et acides aminés. Chez la vigne, une étude a montré l'annulation de l'effet de HCN sur la levée de dormance avec l'application d'un inhibiteur de canaux calcium (le LaCl₃) (Pang et al., 2007). Cela suggère une implication des canaux calcium dans la réponse au stress oxydatif engendré par le blocage de la chaîne respiratoire. Ces résultats semblent converger vers une implication majeure des stress oxydatifs dans les mécanismes qui conduisent à la levée de dormance.

Chapitre IV Conclusion et Perspectives

Les mécanismes mis en œuvre lors de la dormance, période cruciale dans la vie de la plante, font l'objet d'études depuis plus d'un siècle chez de nombreuses espèces. Les résultats obtenus au cours de ce travail mettent en évidence une forte implication de la capacité de gestion du stress froid puis la capacité de répondre à des températures douces. Ces éléments ont déjà été soulevés chez de nombreuses espèces, ce qui suggère une origine commune des mécanismes mis en œuvre.

Les dosages enzymatiques de métabolites ont permis de d'identifier différentes phases du cycle de la période estivale jusqu'à la floraison : pré-dormance, dormance, levée de dormance et post-dormance avec des profils stables sur deux années. La période de pré-dormance, intégrant la période d'entrée en dormance, reste assez floue : en effet, les tests de forçage de rameaux n'ont montré dans cette période absolument aucune corrélation sur rameau, alors que l'on peut en trouver chez d'autres espèces. Les métabolites montrent quant à eux un profil très stable durant cette période entre les variétés, et semblent indiquer un début de dormance en octobre. Ne disposant que d'une année de prélèvement pour la période de juillet à octobre, il n'est pas possible de statuer sur le caractère stable de cette observation. Si une dynamique semblable était observée une autre année, on pourrait suggérer que la photopériode est un facteur très important, comme ce qui a été montré chez d'autres espèces pérennes.

La période d'endodormance est une période de faible activité métabolique. A la faveur des températures froides et d'une possible hypoxie, la diminution de l'activité de la chaîne respiratoire entraîne un stress oxydatif. Ce stress oxydatif est un signal qui déclenche non pas directement la reprise de l'activité métabolique et notamment de la chaîne de respiration mitochondriale, mais la capacité de ce système à reprendre lorsque les températures seront douces. Ceci expliquerait que l'application d'HCN en chambre chaude provoque un double stress oxydatif, léthal. Les différences observées entre variétés étudiées, notamment pour les besoins en froid rendent compte des capacités différentes à répondre à un stress : les variétés très précoces accepteraient moins de stress que les variétés tardives. Ainsi, provoquer un stress non léthal quel qu'il soit devrait pouvoir enclencher la levée de dormance, dès que le seuil de la variété est dépassé. Cette hypothèse de l'implication d'un stress oxydatif a été montrée dans la germination des graines de nombreuses espèces. De plus, certaines études tendent à montrer le même phénomène pour la levée de dormance chez les espèces pérennes. Ainsi les mécanismes existant dans la graine et dans les bourgeons sont comparables (Leida et al., 2012). Il semblerait que les flux de calcium pouvant survenir après un stress oxydatif jouent un rôle, comme cela a été montré sur la vigne et la nectarine (Pang et al., 2007 ; Tan et

al., 2015). Le signal et les mécanismes mis en œuvre pour permettre aux bourgeons de répondre aux températures chaudes restent néanmoins pour le moment inconnus. Des modifications épigénétiques, décrites chez d'autres espèces (Ríos et al., 2014 ; Santamaría et al., 2011) et plus récemment sur le cerisier pourraient être impliquées (Vimont, 2017).

A l'avenir, il serait intéressant d'approfondir les mécanismes liés au stress oxydatif qui apparaissent comme étant déterminants suite aux résultats de cette thèse. Dans ce but, il faudrait doser au cours du temps dans les bourgeons le H_2O_2 . Toutefois, la durée de vie de cette molécule étant très courte, ce dosage pourrait être problématique. A défaut, on pourrait évaluer la capacité antioxydante totale des bourgeons. Cela pourrait éventuellement permettre, outre le dosage des sucres, de déterminer très précisément la phase dans laquelle se trouvent les bourgeons.

Cette étude a été ciblée sur une période du cycle allant de juillet à la date de floraison. Il serait essentiel d'étendre ce travail à l'ensemble du cycle de cerisier. Il serait également intéressant de tester l'effet de températures élevées à différents moments du cycle pour identifier les périodes critiques. Pour cela, des études en chambre climatique sur des arbres en pot de variétés contrastées pour les besoins en froid, seront initiées prochainement et seront comparées aux mêmes variétés maintenues en conditions naturelles.

Les résultats d'expression de gènes devront être confirmés par des études de cartographies génétiques, QTL et localisation de gènes candidats. Pour ces analyses, une population 'Regina' x 'Garnet' d'un millier d'individus est déjà disponible et une seconde famille issue du croisement 'Cristobalina' x 'Regina' pourra être évaluée très prochainement. De plus, des études de génétique d'association basée sur une core collection de 100 variétés (Campoy et al., 2016) permettront de valider ces gènes. Par ailleurs, des données moléculaires et génomiques, en cours d'acquisition dans l'équipe (génomome complet de la variété Regina), devraient permettre de mieux comprendre le déterminisme génétique de la dormance chez le cerisier favorisant à terme la sélection de nouveaux génotypes mieux adaptés aux futures conditions climatiques.

Les relations avec l'environnement sont également indispensables à la compréhension des mécanismes impliqués dans la dormance. Des études d'interactions génotype x environnement (G x E) seront initiées dès la saison prochaine à partir d'une descendance implantée dans six sites (deux en France, Espagne, Italie, Royaume Uni, Slovaquie). Bien que la dormance soit sous le contrôle majoritaire de mécanismes internes aux bourgeons,

différents facteurs interviennent probablement et devront être étudiés tels que l'effet du porte-greffe, de l'alimentation hydrique et azotée et des pratiques culturales telles que la taille.

Dans un contexte de changement climatique, la compréhension des mécanismes de la levée de dormance est importante afin de mettre en œuvre des techniques permettant aux producteurs de pallier les manques de froid, notamment dans les régions du Sud de l'Europe. Il existe de nombreuses sources de stress applicables aux arbres, comme, une simulation d'attaques de pathogènes, l'utilisation de rayons etc. A partir des connaissances sur le stress, de nouveaux outils de levée de dormance pourraient être proposés pour trouver une alternative aux produits chimiques interdits en arboriculture.

Références Bibliographiques

Agreste Primeur N°277, 2012, Exploitations arboricoles et vergers – Recensement agricole 2010

Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., and Burgos, L. (2008). Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environ. Exp. Bot.* 64, 162–170. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.01.003.

Amaki, K., Saito, E., Taniguchi, K., Joshita, K., and Murata, M. (2011). Role of chlorogenic acid quinone and interaction of chlorogenic acid quinone and catechins in the enzymatic browning of apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 829–832. doi:10.1271/bbb.100444.

Arias, O. (1974). L'évolution physiologique des bourgeons de cerisier *Prunus avium* L., cv F12/1 et ses relations avec leurs potentialités morphogènes. Faculté des sciences agronomiques de l'état, Gembloux, Belgique, 193 p.

Bachelard, E. P., and Wightman, F. (1973). Biochemical and physiological studies on dormancy release in tree buds. I. Changes in degree of dormancy, respiratory capacity, and major cell constituents in overwintering vegetative buds of *Populus balsamifera*. *Can. J. Bot.* 51, 2315–2326. doi:10.1139/b73-299.

Budjdosó G and Hrotkó K. 2017 'Cherry production'. Chap 1, pp 1-13 in Cherries: Botany, Production and Uses. CABI, Oxfordshire (UK), Boston (USA). Ed by Quero-García J, Iezzoni A, Puławska J and G Lang.

Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbineau, F., and Leymarie, J. (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 34, 980–993. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x.

- Bonhomme, M., Rageau, R., and Gendraud, M. (2000). Influence of temperature on the dynamics of ATP, ADP and non-adenylic triphosphate nucleotides in vegetative and floral peach buds during dormancy. *Tree Physiol.* 20, 615–621. doi:10.1093/treephys/20.9.615.
- Bonhomme, M., Rageau, R., Lacointe, A., and Gendraud, M. (2005). Influences of cold deprivation during dormancy on carbohydrate contents of vegetative and floral primordia and nearby structures of peach buds (*Prunus persica* L. Batch). *Sci. Hortic.* 105, 223–240. doi:10.1016/j.scienta.2005.01.015.
- Browning, G. (1973). Flower Bud Dormancy in *Coffea arabica* L. I. Studies of Gibberellin in Flower Buds and Xylem Sap and of Abscissic Acid in Flower Buds in Relation to Dormancy Release. *J. Hortic. Sci.* 48, 29–41. doi:10.1080/00221589.1973.11514504.
- Burger, P., Terral, J.-F., Ruas, M.-P., Ivorra, S., and Picq, S. (2011). Assessing past agrobiodiversity of *Prunus avium* L. (*Rosaceae*): a morphometric approach focussed on the stones from the archaeological site Hôtel-Dieu (16th century, Tours, France). *Veg. Hist. Archaeobotany* 20, 447. doi:10.1007/s00334-011-0310-6.
- Campoy, J. A., Lerigoleur-Balsemin, E., Christmann, H., Beauvieux, R., Girollet, N., Quero-García, J., et al. (2016). Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. *BMC Plant Biol.* 16, 49. doi:10.1186/s12870-016-0712-9.
- Campoy, J. A., Ruiz, D., and Egea, J. (2011). Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Sci. Hortic.* 130, 357–372. doi:10.1016/j.scienta.2011.07.011.
- Castède, S. (2014). 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, Université de Bordeaux, 263 p.
- Castède, S., Campoy, J. A., García, J. Q., Le Dantec, L., Lafargue, M., Barreneche, T., et al. (2014). Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytol.* 202, 703–715. doi:10.1111/nph.12658.
- Chmielewski, F.-M., and Rötzer, T. (2001). Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agric. For. Meteorol.* 108, 101–112. doi:10.1016/S0168-1923(01)00233-7.
- Codignola, A., Maffei, M., and Fieschi, M. (1988). Phenols and bud dormancy I. Variations in total phenols and phenylalanine ammonia lyase activity in dormant buds of *Fagus sylvatica* L. *New Phytol.* 108, 83–89. doi:10.1111/j.1469-8137.1988.tb00207.x.
- Collins, M., Knutti, R., Abadía, J., Dufresne, J.-L., Fichet, T., Friedlingstein, P., et al. (2013). “Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility”, pp 1029–1076, in *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, Ed by Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM.

- Considine, M. J., and Considine, J. A. (2016). On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 3189–3203. doi:10.1093/jxb/erw138.
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5665>.
- De Cuyper, B., Sonneveld, T., and Tobutt, K. R. (2005). Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol. Ecol.* 14, 945–955. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02460.x.
- De Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Diaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., and Hernández, J. A. (2013). Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Rep.* 32, 1491–1502. doi:10.1007/s00299-013-1473-7.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W., et al. (2004). Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9891–9896. doi:10.1073/pnas.0307937101.
- El-Maarouf-Bouteau, H., and Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* 3, 175–182.
- Ercisli S (2014). Diversity studies on cherry germplasm in Turkey. In: Working groups meeting, COST Action 1104: 13-15 October 2014; Bordeaux
- Erez, A., and Lavee, S. (1971). Effect of climatic conditions on dormancy development of peach buds. I. Temperature. *Amer Soc Hort Sci J.* 96, 711–714.
- Evans, R. C., Alice, L. A., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., and Dickinson, T. A. (2000). The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the *Rosaceae*: multiple loci and phylogenetic utility. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 388–400. doi:10.1006/mpev.2000.0828.
- Faust, M., and Surányi, D. (1996). “Origin and Dissemination of Cherry,” in *Horticultural Reviews*, ed. J. Janick (John Wiley & Sons, Inc.), 263–317. doi:10.1002/9780470650622.ch5.
- Felker, F. C., Robitaille, H. A., and Hess, F. D. (1983). Morphological and Ultrastructural Development and Starch Accumulation During Chilling of Sour Cherry Flower Buds. *Am. J. Bot.* 70, 376–386. doi:10.2307/2443246.
- Fennell, A. Y., Schlauch, K. A., Gouthu, S., Deluc, L. G., Khadka, V., Sreekantan, L., et al. (2015). Short day transcriptomic programming during induction of dormancy in grapevine. *Funct. Plant Ecol.*, 834. doi:10.3389/fpls.2015.00834.
- Ferry-Dumazet, H., Gil, L., Deborde, C., Moing, A., Bernillon, S., Rolin, D., et al. (2011). MeRy-B: a web knowledgebase for the storage, visualization, analysis and annotation of plant NMR metabolomic profiles. *BMC Plant Biol.* 11, 104. doi:10.1186/1471-2229-11-104.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 387–415. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740.

- Fishman, S., Erez, A., and Couvillon, G. A. (1987). The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *J. Theor. Biol.* 124, 473–483. doi:10.1016/S0022-5193(87)80221-7.
- France Agrimer- La cerise en 2016 : bilan de campagne
<http://www.franceagrimer.fr/content/download/48825/468531/file/BIL-CERISE-Camp.2016.pdf>
- Ghiassi Tarzi, B., Gharachorloo, M., Baharinia, M., and Mortazavi, S. A. (2012). The Effect of Germination on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Chickpea. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 11, 1137–1143.
- Götz, K.-P., Chmielewski, F.-M., Homann, T., Huschek, G., Matzneller, P., and Rawel, H. M. (2014). Seasonal changes of physiological parameters in sweet cherry (*Prunus avium* L.) buds. *Sci. Hortic.* 172, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.04.012>.
- Hedrick, U. P., Howe, G. H., Taylor, O. M., Tubergen, C. B., and Wellington, R. (1915). *The cherries of New York*. Albany, J. B. Lyon Company, state printers.
- Hsu, C.-Y., Liu, Y., Luthe, D. S., and Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18, 1846–1861. doi:10.1105/tpc.106.041038.
- Iezzoni A, Wunsch A, Höfer M, Giovannini D, Jensen M, Quero-Garcia J, Campoy J A, Vovurka, and Barreneche T. (2017). ‘Biodiversity Gerplasm Resources and Breeding Methods’, Chap 3, pp 36-59 in *Cherries: Botany, Production and Uses*. CABI, Oxfordshire (UK), Boston (USA). Ed by Quero-García J, Iezzoni A, Puławska J and G Lang.
- 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*, Ed by Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp, doi:10.1017/CBO9781107415324
- Jones, H. G., Gordon, S. L., and Brennan, R. M. (2015). Chilling requirement of *Ribes* cultivars. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00767.
- Jones, K. S., Paroschy, J., Mckersie, B. D., and Bowley, S. R. (1999). Carbohydrate Composition and Freezing Tolerance of Canes and Buds in *Vitis vinifera*. *J. Plant Physiol.* 155, 101–106. doi:10.1016/S0176-1617(99)80146-1.
- Kiehl, J. T., and Trenberth, K. E. (1997). Earth’s Annual Global Mean Energy Budget. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 78, 197–208.
- Kirtman, B., Power, S., Adedoyin, J., Boer, G., Bojariu, R., Camilloni, I., et al. (2013). “Near-term Climate Change: Projections and Predictability, pp 953–1028 in “*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 University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, Ed by Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley.

- Kong, L., Aderkas, P. von, and Zaharia, L. I. (2015). Effects of Exogenously Applied Gibberellins and Thidiazuron on Phytohormone Profiles of Long-Shoot Buds and Cone Gender Determination in Lodgepole Pine. *J. Plant Growth Regul.* 35, 172–182. doi:10.1007/s00344-015-9517-6.
- Koornneef, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 33–36. doi: 10.1016/S1369-5266(01)00219-9.
- Koussa, T., Broquedis, M., and Bouard, J. (1994). Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la phase de levée de dormance. *Vitis* 33, 63–67.
- Koussa, T., Cherrad, M., Bertrand, A., and Broquedis, M. (1998). Comparaison de la teneur en amidon, en glucides solubles et en acide abscissique des bourgeons latents et des entre-nœuds au cours du cycle végétatif de la vigne. *Vitis* 37, 5–10.
- Lang, G., Early, J., Martin, G., and Darnell, R. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22, 371:377.
- Lang, G. 2017. Sweet cherry industry in USA: current trends and future perspectives (Document Powerpoint). VIII International Cherry Symposium, Yamagata, Japon, 5-9 June 2017, Yamagata, Japan.
- Legave, J. M., Blanke, M., Christen, D., Giovannini, D., Mathieu, V., and Oger, R. (2013). A comprehensive overview of the spatial and temporal variability of apple bud dormancy release and blooming phenology in Western Europe. *Int. J. Biometeorol.* 57, 317–331. doi:10.1007/s00484-012-0551-9.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., and Metraux, J.-P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54–62. doi:10.1016/j.phytochem.2014.08.027.
- Leida, C., Conejero, A., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2012). Chilling-Dependent Release of Seed and Bud Dormancy in Peach Associates to Common Changes in Gene Expression. *PLoS ONE* 7, e35777. doi:10.1371/journal.pone.0035777.
- Leroy, A. (1867). Dictionnaire de pomologie : contenant l'histoire, la description, la figure des fruits anciens et des fruits modernes le plus généralement connus et cultivés. Tome 5, Partie 1 / par André Leroy, Paris: les principales librairies agricoles et horticoles. Available at: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k54602751>
- Lichou, J., Edin, M., Tronel, C., and Saunier, R. (1990). *Le cerisier. La cerise de table*. Paris (France): CTIFL, 361 p.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., and Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61, 2979–2990. doi:10.1093/jxb/erq125.
- Luedeling, E. (2012). Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. *Sci. Hortic.* 144, 218–229. doi:10.1016/j.scienta.2012.07.011.

- Mauget, J. (1976). First results on vegetative bud dormancy in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci.* D 283, 499:502.
- Masood A., Per TS, Asgher M, Fatma M, Khan IR, Rasheed F, Hussain SJ, Khan NA (2016). Glycine Betaine: Role in Shifting Plants Toward Adaptation Under Extreme Environments, pp 69-82. In: “*Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*”, Springer, New Delhi, Ed by Iqbal N., Nazar R., A. Khan N.
- Meier U, Graf H, Hack H, Hess M, Kennel W, Klose R, Mappes D, Seipp D, Strauss 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. *Int. J. Biometeorol.* 44, 76–81. <https://doi.org/10.1007/s004840000054>
- Moing, A., Renaud, C., Christmann, H., Fouilhaux, L., Tauzin, Y., Zanetto, A., et al. (2004). Is There a Relation between Changes in Osmolarity of Cherry Fruit Flesh or Skin and Fruit Cracking Susceptibility? *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129, 635–641.
- Morgan, D. R., Soltis, D. E., and Robertson, K. R. (1994). Systematic and Evolutionary Implications of rbcL Sequence Variation in Rosaceae. *Am. J. Bot.* 81, 890–903. doi:10.2307/2445770.
- Morin, X., Améglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., et al. (2007). Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiol.* 27, 817–825.
- Moss, R. H., Edmonds, J. A., Hibbard, K. A., Manning, M. R., Rose, S. K., van Vuuren, D. P., et al. (2010). The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature* 463, 747–756. doi:10.1038/nature08823.
- Nath, S., and Mandahar, C. L. (1988). Involvement of gibberellins in breaking bud dormancy in *euphorbia* crinkle mosaic virus-infected stem cuttings of *Euphorbia pulcherrima* Willd. *Biol. Plant.* 30, 260. doi:10.1007/BF02878205.
- Nicolas, W. J., Grison, M. S., Trépout, S., Gaston, A., Fouché, M., Cordelières, F. P., et al. (2017). Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nat. Plants* 3, 17082. doi:10.1038/nplants.2017.82.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., and Bailly, C. (2009). The Mechanisms Involved in Seed Dormancy Alleviation by Hydrogen Cyanide Unravel the Role of Reactive Oxygen Species as Key Factors of Cellular Signaling during Germination. *Plant Physiol.* 150, 494–505. doi:10.1104/pp.109.138107.
- 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 du XXI^e siècle, Volume 4, Ministère de l’Ecologie, du Développement durable et de l’Energie. Available at <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/144000543.pdf>.

- Overcash, J. ., and Campbell, J. . (1955). The Effects of Intermittent Warm and Cold Periods on Breaking the Rest Period of Peach Leaf Buds. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 66, 87–92.
- Pagter, M., Andersen, U. B., and Andersen, L. (2015). Winter warming delays dormancy release, advances budburst, alters carbohydrate metabolism and reduces yield in a temperate shrub. *AoB Plants* 7. doi:10.1093/aobpla/plv024.
- Pang, X., Halaly, T., Crane, O., Keilin, T., Keren-Keiserman, A., Ogradovitch, A., et al. (2007). Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds. *J. Exp. Bot.* 58, 3249–3262. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm172>
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J.-M., Basile, I., et al. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399, 429–436. doi:10.1038/20859.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., et al. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst. Evol.* 266, 5–43. doi:10.1007/s00606-007-0539-9.
- Putti, G. L., Petri, J. L., and Mendez, M. E. (2003). Effective temperatures for apple tree dormancy (*Malus domestica* Borkh). *Rev. Bras. Frutic.* 25, 210–212. doi:10.1590/S0100-29452003000200006.
- Quero-García, J., Schuster, M., López-Ortega, G., and Charlot, G. (2017). Sweet cherry varieties and improvement. In *Cherries: Botany, Production and Uses*, J. Quero-García, A. Lezzoni, J. Pulawska, and G. Lang, eds. (Wallingford: CABI), pp. 60–94.
- Rehder, A. (1949). *Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the Northern Hemisphere*, Arnold Arboretum of Harvard Univ., Jamaica Plain, Mass. Available at <http://www.biodiversitylibrary.org/item/122372>.
- Rehder, A. (1974). *Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America: Exclusive of the Subtropical and Warmer Temperate Regions*, Macmillan, Alplaus, NY, U.S.A
- Richardson, E. R., Seeley, S. D., Walker, D. R., Richardson, M. A., Seeley, S. K., Walker, D. R., et al. (1974). A model for estimating the completion of rest for ‘Redhaven’ and ‘Elberta’ peach trees. *HortScience* 9, 331–332.
- Rinne, P. L., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjärvi, J., et al. (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1, 3- β -glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell Online* 23, 130–146. doi: 10.1105/tpc.110.081307
- Rinne, P., Welling, A., and Kaikuranta, P. (1998). Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype. *Plant Cell Environ.* 21, 601–611. doi:10.1046/j.1365-3040.1998.00306.x.
- Ríos, G., Leida, C., Conejero, A., and Badenes, M. L. (2014). Epigenetic regulation of bud dormancy events in perennial plants. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00247.

- Santamaría, M. E., Rodríguez, R., Cañal, M. J., and Toorop, P. E. (2011). Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. *Ann. Bot.* 108, 485–498.
- Schmidt, H. (1973). Investigations on breeding dwarf rootstocks for sweet cherries. I. Flower differentiation and development in *Prunus* species and forms. *Z. Fuer Pflanzenzuechtung*, 72–82.
- Schüller, E. 2014. Comparing results of phenotypic characterization and genetic fingerprints for traditional sweet cherry varieties. COST-Cherry 114 WG 1 – Genetic Resources and Breeding, Genetics and Genomics-« Use of Molecular Markers for Diversity Studies » Meeting, 03-05 March, Budapest.
- Schuster, M. (2012). Incompatible (S-) genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.* 148, 59–73. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.012.
- Schwartz, M. D., and Hanes, J. M. (2010). Continental-scale phenology: warming and chilling. *Int. J. Climatol.* 30, 1595–1598. doi:10.1002/joc.2014.
- Shi, S., Li, J., Sun, J., Yu, J., and Zhou, S. (2013). Phylogeny and classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae). *J. Integr. Plant Biol.* 55, 1069–1079. doi:10.1111/jipb.12095.
- Sugiura, T., Yoshida, M., Magoshi, J., and Ono, S. (1995). Changes in water status of peach flower buds during endodormancy and ecodormancy measured by differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120, 134–138.
- Tan, Y., Gao, D.-S., Li, L., Wei, H.-R., Wang, J.-W., and Liu, Q.-Z. (2015). Relationships between H₂O₂ metabolism and Ca²⁺ transport in dormancy-breaking process of nectarine floral buds. *The Journal of Applied Ecology.* 26, 425–429.
- Tavaud, M. (2000). 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. École nationale supérieure agronomique (Montpellier), 101 p.
- Tilsner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E. M. (2016). Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 337–364. doi:10.1146/annurev-arplant-043015-111840.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. doi:10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x.
- Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J. F., Harano, Y., Ioannidis, Y. E., Lin, J., et al. (2008). BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* 36, D402–D408. doi:10.1093/nar/gkm957.
- Vimont, N. (2017). Molecular and epigenetic mechanisms during dormancy in sweet cherry flower buds ((Document Powerpoint). VIII International Cherry Symposium, Yamagata, Japon, 5-9 June 2017.
- Wang, D., Gao, Z., Du, P., Xiao, W., Tan, Q., Chen, X., et al. (2015). Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Front. Plant Sci.* 6, 1248. doi: 10.3389/fpls.2015.01248

- Webster, A and Looney N (1996). *The taxonomic classification of sweet and sour cherries and a brief history of their cultivation*. CABI, Oxfordshire (UK), Boston (USA), Ed by Webster, A.D and Looney, N.E, 464 p.
- Weinberger, J. H. (1950). Chilling requirements of peach varieties. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 56, 122–28.
- Wiebe, R., and Gaddy, V. L. (1940). The Solubility of Carbon Dioxide in Water at Various Temperatures from 12 to 40° and at Pressures to 500 Atmospheres. Critical Phenomena. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 815–817. doi:10.1021/ja01861a033.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., et al. (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D801-807. doi:10.1093/nar/gks1065.
- Yooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Yamaguchi, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., et al. (2008). Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiol. Plant.* 134, 522–533. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01143.x.
- Young, E. (1990). Changes in Respiration Rate and Energy of Activation after Chilling and Forcing Dormant Apple Trees. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115, 809–814.
- Zhu, X., Chen, B., Ma, M., Luo, X., Zhang, F., Yao, S., et al. (2004). Simultaneous analysis of theanine, chlorogenic acid, purine alkaloids and catechins in tea samples with the help of multi-dimension information of on-line high performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 695–704. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00605-8
- FAOstat <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Consulté le 03/10/2017.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Article : Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species : A Pivotal Role for Oxidative Cues



Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species: A Pivotal Role for Oxidative Cues

Rémi Beauvieux, Bénédicte Wenden and Elisabeth Dirlwanger*

UMR 1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, Paris, France

For perennial plants, bud dormancy is a crucial step as its progression over winter determines the quality of bud break, flowering, and fruiting. In the past decades, many studies, based on metabolic, physiological, subcellular, genetic, and genomic analyses, have unraveled mechanisms underlying bud dormancy progression. Overall, all the pathways identified are interconnected in a very complex manner. Here, we review early and recent findings on the dormancy processes in buds of temperate fruit trees species including hormonal signaling, the role of plasma membrane, carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration and oxidative stress, with an effort to link them together and emphasize the central role of reactive oxygen species accumulation in the control of dormancy progression.

Keywords: bud dormancy, perennial fruit species, hormonal pathways, carbohydrate metabolism, oxidative stress

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael James Considine,
The University of Western Australia,
Australia

Reviewed by:

Robert D. Hancock,
James Hutton Institute,
United Kingdom
David Horvath,
Agricultural Research Service (USDA),
United States

*Correspondence:

Elisabeth Dirlwanger
elisabeth.dirlwanger@inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 16 February 2018

Accepted: 30 April 2018

Published: 16 May 2018

Citation:

Beauvieux R, Wenden B and
Dirlwanger E (2018) Bud Dormancy
in Perennial Fruit Tree Species:
A Pivotal Role for Oxidative Cues.
Front. Plant Sci. 9:657.
doi: 10.3389/fpls.2018.00657

INTRODUCTION

In the context of perennial plants, bud dormancy is a crucial step in the phenology cycle, as its progression over winter determines the quality of bud break, flowering and fruiting. The term "dormancy" is associated with temporary suspension of visible growth. It comprises true dormancy ("rest" or "endodormancy") triggered by internal factors, and climatic dormancy ("quiescence" or "ecodormancy") controlled by external factors (Lang et al., 1987; Considine and Considine, 2016). These phases of dormancy are alleviated by different elements: release of endodormancy requires cold accumulation whereas ecodormancy advances with heat accumulation toward bud break. For perennial fruit species, in the context of global warming, endodormancy release may be a critical step in the future due to insufficient chill accumulation, directly affecting flowering quality and uniformity, and thus leading to a drastic reduction of fruit production. In the past decades, much work has been done to unravel the mechanisms underlying dormancy period, and the diversity of approaches used is indicative of the complexity of the trait. Early studies at the beginning of the 20th century mainly dealt with the observation of the phenomenon itself and the effects of dormancy alleviating molecules. In the 70s, advances in microscopy and subcellular techniques allowed novel observations of cellular modifications over the dormancy period. Later, between 1980 and 2000, physiological studies including metabolic analyses led to further description of the main pathways involved, more recently highlighted by genetic and genomic studies. Numerous studies, notably transcriptomic analyses, have led to the identification of common molecular pathways regulating bud dormancy in trees (Rohde et al., 2007; Ruttink et al., 2007; Yamane et al., 2008; Jiménez et al., 2010; Leida et al., 2010; El Kayal et al., 2011; Liu et al., 2012; Bai et al., 2013; Zhong et al., 2013; Xu et al., 2016; Tarancón et al., 2017). Specific gene expression patterns over the course of dormancy featured hormone signaling, carbon metabolism, stress response and chromatin

modification (Regier et al., 2010; Rios et al., 2014; Saito et al., 2015; Wisniewski et al., 2015; Wen et al., 2016). Among the main pathways identified, the *Dormancy-Associated MADS-BOX (DAM)* genes have been a constant interest since they were proposed to cause the non-dormant phenotype of the *evg* mutant of peach (Rodriguez et al., 1994; Bielenberg et al., 2004, 2008; Howe et al., 2015). In peach, the six tandem-arrayed *DAM* genes display distinct seasonal patterns with peaks in expression at different times during dormancy (Li et al., 2009), supporting their role in promoting and maintaining dormancy (Jiménez et al., 2010; Hao et al., 2015). Following this finding, *DAM* genes and their involvement in dormancy have been extensively studied in perennial plants including leafy spurge (Horvath et al., 2008; Anderson et al., 2010), apple (Mimida et al., 2015), Japanese pear (Ubi et al., 2010; Saito et al., 2013), tea plant (Hao et al., 2017), Kiwifruit (Wu et al., 2017), and Japanese apricot (Yamane et al., 2008; Sasaki et al., 2011). In poplar, genes homologous to *CONSTANS (CO)* and *FLOWERING LOCUS T (FT)* have key roles in the control of dormancy (Bohlenius et al., 2006; Hsu et al., 2011; Srinivasan et al., 2012) and the chill-induced release of endodormancy (Rinne et al., 2011). Recent reviews have nicely described the molecular advances in dormancy studies (Cooke et al., 2012; Rios et al., 2014; Sanchez-Perez et al., 2014) therefore we will not focus our attention on these aspects. Overall, all these pathways are interconnected in a very complex manner and so far no integrative scenario has been proposed to precisely describe their interactions. Nonetheless one particular pathway seems central and is almost always highlighted in the recent studies: the response to oxidative stress and the reactive oxygen species (ROS). Notably, most of the studies using dormancy release substances such as HC (Hydrogen Cyanamide) show they induce the ROS scavenging systems. Interestingly, ROS are also thought to be a key signal during plant development for many aspects including dormancy (Considine and Foyer, 2014), as shown by their link to the hormonal interplay, cell wall loosening, and ion channels in seeds. Here, we review both early and recent findings on the dormancy processes in buds of temperate fruit trees species including hormonal signaling, the role of plasma membrane, carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration and oxidative stress, with an effort to link them together and emphasize the central role of ROS accumulation in the control of endo- and ecodormancy progression.

OXIDATIVE STRESS AND REDOX CUES

In contrast to chilling-induced breaking of dormancy, exposing dormant buds to sub-lethal freezing and high temperatures as well as other sub-lethal treatments for a short period of time can overcome rest relatively rapidly (Orflier and Goussard, 1980; Nee and Fuchigami, 1992). Following these observations, numerous lines of evidence have highlighted that stresses, especially oxidative and respiratory stresses, are involved in the release of buds from dormancy. These stresses trigger the production of ROS, which have been shown to be critical throughout plant life and development (Considine and Foyer, 2014). This production of ROS including H_2O_2 in buds suggests

that they may act as key signaling molecules for dormancy release (Kuroda et al., 2002, 2005; Pérez and Burgos, 2004; Prassinis et al., 2011; Vergara et al., 2012; Hussain et al., 2015; Tan et al., 2015). These hypotheses are further supported by observations that exogenous H_2O_2 can substitute for chilling, thus confirming that an increase in H_2O_2 levels may activate the sequence of reactions involved in the breaking of bud dormancy (Pérez and Burgos, 2004; Kuroda et al., 2005; Pérez et al., 2008). Conversely, treatment of potato tuber with a NADPH oxidase inhibitor leads to decreased ROS production and delayed dormancy release (Liu et al., 2017). In plant cells, ROS are continuously produced as a consequence of aerobic metabolism in all the intracellular organelles. Cells have the capacity to rapidly produce and scavenge different forms of ROS levels, as a result of a balance between formation and detoxification rates, with a tight link to cellular metabolism, making ROS good signals to monitor changes in cellular metabolism (Mittler et al., 2011). Another indication that oxidative stress is an important part of the process of dormancy is that antioxidant defense and detoxification pathways are upregulated during dormancy release, including catalase (CAT), glutathione peroxidase (GR), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase superfamily proteins (Scalabrelli et al., 1991; Or et al., 2000; Halaly et al., 2008; Leida et al., 2010; Prassinis et al., 2011; Vergara et al., 2012; Viti et al., 2012; Bai et al., 2013; Zhuang et al., 2013; Guzicka et al., 2017). This is especially true for buds treated with dormancy-breaking compounds. In apricot flower buds, gibberellic acid 4 (GA_4) treatment upregulates oxidation-reduction proteins and the authors hypothesized that GA_4 application led to the development of oxidative stress and to subsequent dormancy release (Zhuang et al., 2013). HC has been widely used by growers to overcome low and uneven bud break and the mechanisms that underlies its dormancy-breaking effect is extensively studied in fruit species. Many studies show that a significant increase in H_2O_2 levels is the main metabolic change produced by HC, often linked to an inhibition of CAT activity (Bartolini et al., 1996; Pérez and Lira, 2005; Halaly et al., 2008; Pérez et al., 2009; Tan et al., 2015). However, recent genomic studies show that a wide range of genes is differentially regulated after HC application such as genes related to cell wall loosening, hormonal response, carbohydrate and protein metabolism (Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Liu et al., 2015; Sudawan et al., 2016; Ionescu et al., 2017) thus linking oxidative stress, mitochondrial activity, hypoxia, cytokinins, auxin, jasmonate and ethylene signaling pathways to HC-induced dormancy release. Based on these findings, HC application is thought to trigger transient oxidative stress and activate detoxification systems. Subsequently, most pathways proposed to be involved in dormancy release are activated: degradation of callose, inhibition of abscisic acid (ABA), GAs, glycolysis, cytokinins (Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Zheng et al., 2015; Ionescu et al., 2017). Another clue for the involvement of ROS during dormancy is the response of several ROS scavenging systems that were closely analyzed during bud dormancy. The glutathione and ascorbate pathways are crucial for the detoxification of H_2O_2 . The overall content of glutathione was shown to increase in concomitance with the endodormancy

overcoming. Moreover, the ratio between reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, was reported to be associated to the dormancy stage: higher levels of GSH at the end of rest compared to beginning of the phase (Siller-Cepeda et al., 1992; Wang and Faust, 1994; Kocsy et al., 2001; Bartolini et al., 2006). This ratio has been shown to be under the control of the glutathione reductase (GR) activity in Japanese pear (Zanol et al., 2010). In dormant grapevine buds, HC upregulates genes involved in ascorbate, glutathione and pentose phosphate pathway (PPP) detoxification pathways (Pérez et al., 2009; Sudawan et al., 2016). Temporary induction of the PPP in response to oxidative stress may provide a way to recharge the system with NADPH for detoxification through the ascorbate/glutathione system (Figure 1). Such an induction has been observed in apricot buds after a treatment with GA₄ (Zhuang et al., 2015), thus allowing the production of NADPH in the absence of mitochondrial respiration. All these studies provide evidence that ROS play a crucial role during dormancy and raise the questions of the mechanism involved in the oxidation system, especially how other pathways interact or are directly controlled by oxidative cues.

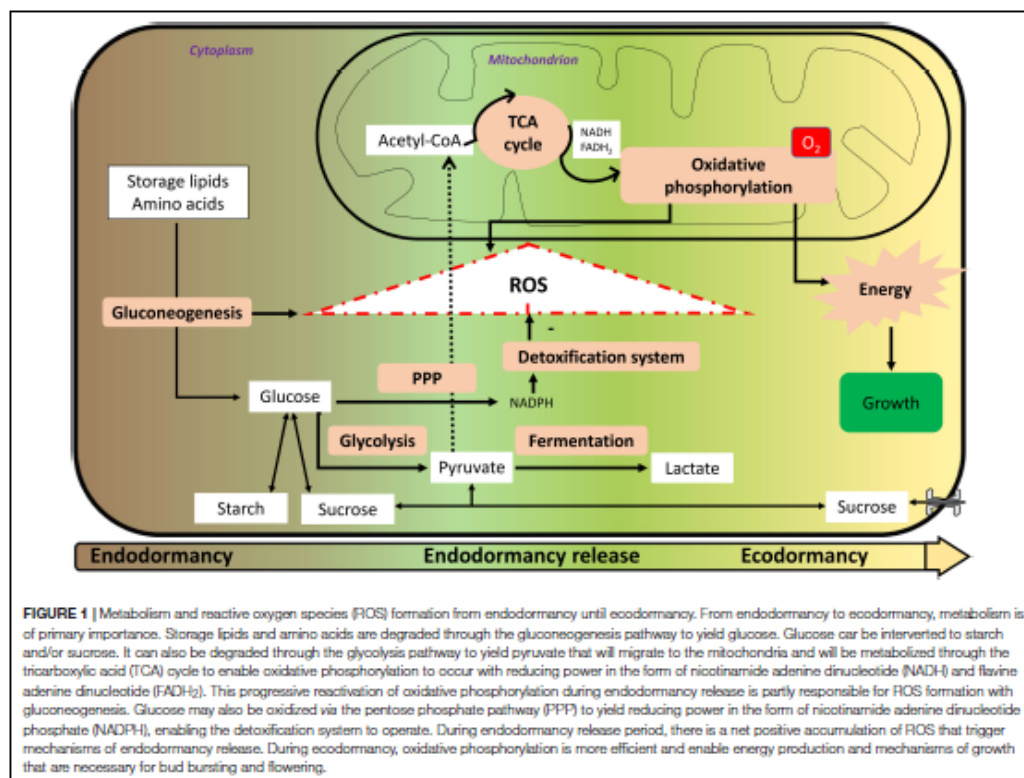
MITOCHONDRIAL RESPIRATION

Mitochondrial respiration is the primary cellular source of ROS on non-photosynthetic tissues in the context of healthy conditions (Van Aken et al., 2009), whereas plasma membrane and cell-wall NADPH/NADH oxidases are major producers in the context of defense response (Davies et al., 2006). An elevation of ROS production is noted in abnormal conditions, such as hypoxia or hyperoxia (Turrens, 2003). During dormancy, hypoxia and the inhibition of mitochondrial respiration can be responsible for the increase in ROS content observed in dormant buds (Vergara et al., 2012; Meitha et al., 2015, 2018), potentially by activating gluconeogenesis, and therefore enhances grape bud dormancy release (Ophir et al., 2009; Rubio et al., 2014; Sudawan et al., 2016). Likewise, O₂ deprivation raises glycolysis and ethanolic fermentation which could lead to the production of ROS (Pérez et al., 2009). Moreover, treatment of isolated grape bud mitochondria with sodium azide, another dormancy release molecule, inhibited O₂ uptake (Pérez et al., 2009) and mitochondria under hypoxia have been shown to have less TCA cycle enzyme activities and reduced ATP production in maize and potato (Considine et al., 2017). In response to shortening photoperiod and low temperature, respiration may be impaired as part of the growth cessation and dormancy onset processes. For example, ABA, which participates to dormancy maintenance, has been shown to inhibit certain isoforms of the tricarboxylic acid (TCA) cycle isozymes in floral buds of peach (Oncelay et al., 1979) or sucrose transporters in vine (Murcia et al., 2015), thus comforting the hypotheses that respiration processes are affected during dormancy. All these elements suggest that a respiratory stress must be involved in the release of buds from dormancy through abnormal positive net production of ROS.

Regulation of respiration is central to the transition from rest to metabolically active state, generating the ATP needed for cell

functioning and growth. In aerobic respiration, mitochondria carry out the final steps of this process and generate the bulk of ATP through (i) the TCA cycle, (ii) the oxidative phosphorylation electron chain, (iii) the alternative oxidase (AOX), and (iv) the set of carriers and channels that provide the substrates and cofactors from the cytosol. Respiration rate and depth of dormancy were shown to be inversely related in grapevine buds (Parada et al., 2016), associated with contrasted response to temperature and glucose, two stimuli that normally increase respiration in plant tissues. While respiration in non-dormant buds rose sharply in response to both stimuli, respiration in dormant buds was only slightly affected, thus suggesting that respiration is inhibited in dormant buds. Several processes can explain this repression of mitochondrial respiration during dormancy. Firstly, some studies report that mitochondria activity might be altered over dormancy progression, with modifications in their number (Folker et al., 1983) or their structure (Guzicka et al., 2017), and could be linked to availability of oxygen and requirements of oxidative phosphorylation (Considine et al., 2017). Thereafter, respiration in dormant bud cells might be affected. Secondly, as described before, dormant cells are subjected to carbon starvation and repression of cell-to-cell transport, coupled with bud scales that have low oxygen permeability. Analyses of gene expression and O₂ pressure measurements suggest that dormant buds reside in a hypoxic state and return to the oxygenated state during bud burst (Meitha et al., 2015). According to experiments on O₂ consumption and CO₂ production of grapevine twigs in hypoxic conditions (solution of chlorpromazine) or normal conditions, fermentation pathway has been suspected to be involved in dormancy release (Pouget, 1965). Recent findings on transcript abundance of key genes such as lactate dehydrogenase or alcohol dehydrogenase tend to confirm the activation of the fermentation pathway in dormant bud cells under chilling or dormancy-breaking reagent treatments (Or et al., 2000; Halaly et al., 2008; Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009), which is characteristic of low-oxygen conditions. Furthermore, plasma membrane properties are modified during dormancy and we hypothesize that chill modifies the properties of membrane-bound proteins, as was shown for the succinate oxidase activity for mitochondria of Jerusalem artichoke tubers (Chapman et al., 1979): the Arrhenius activation energy was high during dormancy and decreased at the termination of dormancy. Finally, it has been proven that the level of ATP or the ATP/ADP ratio change over dormancy progression: low levels of ATP are characteristic of endodormancy while a steep rise in ATP/ADP ratio marks the end of ecodormancy (Bonhomme et al., 2000). The mitochondrial ATP synthase complex requires inorganic phosphate delivery by the mitochondrial phosphate transporter (MPT). The expression level of MPT is low during dormancy and up-regulated to promote respiratory rate and energy metabolism for bud dormancy release in tree peony (Huang et al., 2008; Zhang et al., 2016). These results are consistent with the hypothesis that phosphate is compartmentalized during dormancy (Bonhomme et al., 2000) leading to the inhibition of respiration and ATP production.

According to all these knowledge, the role of the mitochondrial respiration during the different phases of



dormancy is proposed in **Figure 1**: during endodormancy, hypoxia and the inhibition of mitochondrial respiration can be responsible for the increase in ROS content that reach a maximum at the endodormancy release, and at this stage, recovery of mitochondrial respiration during the ecodormancy period.

CARBOHYDRATES METABOLISM

In addition to the role of mitochondrial respiration toward positive ROS production, carbohydrate metabolism seems to be crucial for ROS systems. During dormancy, a carbon starvation is noted, and glucose is a key molecule. It may be produced via storage molecules such as lipids, notably through beta-oxidation and neoglucogenesis, responsible for a net ROS production (Dieuzaide et al., 1992). On one hand, glucose may be processed in the glycolysis and then metabolized in the mitochondria for ROS production; on the other hand, it may be processed through the PPP to yield reducing power and participate to ROS detoxification. For example, in yeast, it has been shown that low glucose amounts induce a decreased mitochondrial ROS

production (Barros et al., 2004). Interestingly, it has been shown that a switch from glycolysis to PPP during germination in *Arabidopsis* seed is a scavenging system for oxidative stress (Arc et al., 2011).

In addition to its crucial role in the response to cold, carbohydrate metabolism appears essential in the transition from dormancy to active bud growth (**Figure 1**), as suggested by Park et al. (2009) and Signorelli et al. (2018). Changes in carbohydrate dynamics were linked to changes in dormancy status in sweet cherry with a degradation of starch into soluble sugars during dormancy onset and an increase in starch just before budburst (Kaufmann and Blanke, 2017). In parallel with starch dynamics, soluble sugars were shown to increase between autumn and winter followed by a significant decrease between winter and spring (Charrier et al., 2017). The bud capacity to burst is tightly linked to its supply in carbohydrates and as described previously, the carbohydrate uptake capacity increases in the bud after dormancy release with an increase in the expression and activity of plasma membrane transporters. Just before budburst, all sugars are transported in the sap toward the buds but during endodormancy, carbohydrate dynamics are restricted to the bud tissues. Tarancón et al. (2017) proposed that growth

cessation and bud dormancy are consequences of carbon supply starvation syndrome linked to the sugar deficit. Over dormancy progression, and in response to winter conditions, soluble compounds (sucrose, glucose) are synthesized from the reserves accumulated during the growing season, such as starch grains (Felker et al., 1983; Guzicka, 2001; Xu et al., 2016; Guzicka et al., 2017). Interestingly, poplars overexpressing sucrose phosphate synthase – which accumulate more sucrose and starch than the wild-type poplars – are characterized by accelerated bud break, raising the possibility that enhanced sugar and/or starch reserves can promote accelerated dormancy breaking (Park et al., 2009). However, in the context of low carbon supply, it is possible that the gluconeogenesis pathway is activated to produce glucose from non-carbohydrate sources (Figure 1) as reported by Ruttink et al. (2007), associated with the generation of ROS. Similar pathway was described in dormant seeds (Einali and Valizadeh, 2017). In addition, a recent study showed that sucrose was synthesized during GA₄-induced dormancy release (Zhuang et al., 2015), thus confirming the link between soluble sugars content and end of endodormancy.

During dormancy, glucose is metabolized in at least three pathways involved in the cell processes: the PPP leading to a detoxification system, glycolysis that synthesizes the pyruvate necessary for mitochondrial respiration, and fermentation producing lactate (Figure 1). We propose that the balance between all three pathways is key in the control of dormancy release.

HORMONAL SIGNALING

Phytohormones are plant molecules that are produced within the plant and control most, if not all, developmental aspects of plant life (Davies, 2013). ROS and hormones have been shown to act in an interdependent manner (Barba-Espin et al., 2010; Bahin et al., 2011; Oracz and Karpiński, 2016). For example, a recent study has shown this close link between the pathways with an inhibition of ROS formation by ABA, and a promotion of ROS formation by gibberellins (GAs) in seeds during cold stratification (Amooaghaie and Ahmadi, 2017), and conversely ROS mediate ABA and GA regulation through their catabolism and biosynthesis, respectively (Liu et al., 2010).

Hormonal pathways, including ABA, GAs, ethylene, auxin and cytokinins, have been demonstrated to be of great importance in the bud dormancy process (Mielke and Dennis, 1978; Rodríguez and Sánchez-Tamés, 1986; Wang et al., 1987; Piola et al., 1998; Ophir et al., 2009; Doğramaci et al., 2013; Zhuang et al., 2013; Wen et al., 2016; Signorelli et al., 2018). Auxins were reported to be present at different concentration in buds throughout dormancy progression. Dormancy onset and cold treatment induces a reduction in auxin while quantity of auxins rises in ecodormancy until budburst as shown in hazelnuts (Rodríguez and Sánchez-Tamés, 1986) and grapevine (Aloni et al., 1990). It has been shown that auxins can be oxidized by two mechanisms in plants, a H₂O₂-dependent pathway, and a molecular dioxygen pathway, via peroxidases and membrane-bound

NADPH oxidases (Pfeiffer and Höftberger, 2001; Kawano, 2003). Oxidation of auxin may thus yield ROS and be part of their generation during endodormancy progression. In addition, it has been shown in apple that genes related to auxin transport are major regulators of dormancy (Porto et al., 2015), and thus we could make the hypothesis that auxins may be involved to the propagation of the ROS signal through different territories, as this ROS signal propagation has been shown in grape buds during bud bursting (Meitha et al., 2015). Transcriptomic analyses of dormant buds suggest that brassinosteroid, salicylic-acid-, and jasmonic-acid-associated genes are differentially regulated during dormancy (Howe et al., 2015). The ethylene pathway is interesting when focusing on dormancy and oxidative stress signaling. Indeed, ethylene induced bud break in grapevine buds (Ophir et al., 2009) and low-temperature stress and HC treatment, closely linked to oxidative cues as stated before, provoke ethylene biosynthesis, associated with chilling requirement and dormancy release in peach and sweet cherry (El-Shereif et al., 2006; Del Cueto et al., 2017). In addition, the ethylene biosynthesis pathway, starting with ethylene precursors methionine and ACC, increases during endodormancy, resulting in the production of ethylene but also of hydrogen cyanide, therefore leading to increased levels of ROS (Ionescu et al., 2017). In seed dormancy, ABA and GAs act antagonistically thus it is not surprising that both pathways and their interaction have been closely studied in the context of bud dormancy (Rodríguez-Gacio Mdel et al., 2009). ABA has been demonstrated to promote shoot growth cessation and bud dormancy establishment (Le Bris et al., 1999; Guak and Fuchigami, 2001) whereas GA promotes growth and dormancy release (Rinne et al., 2011). In fruit trees, increases in bud ABA content have been reported at the beginning of endodormancy in the fall (Götz et al., 2014; Wang et al., 2016; Tuan et al., 2017; Li et al., 2018) followed by a rapid drop in response to cold (Leida et al., 2012) or dormancy-breaking agents (Seif El-Yazal et al., 2014; Zheng et al., 2015), accompanied by changes in the expression of genes related to ABA biosynthesis and degradation. Several studies showed that the expression of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases (NCED), involved in ABA synthesis, is activated during dormancy induction and maintenance (Fennell et al., 2015; Wang et al., 2016; Chao et al., 2017; Li et al., 2018). In addition, after chilling requirements are satisfied, ABA levels decrease under the control of ABA 8'-hydroxylase (encoded by *CYP707A*), which is up-regulated during dormancy release (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2016; Tuan et al., 2017; Li et al., 2018). Alternatively, inhibition of active ABA might be related to the production of conjugated forms of ABA that increases in response to cold temperatures: glucose ester of ABA (ABA-GE) in *Vitis* (Koussa et al., 1994) and an ABA-isomer in cherry (Götz et al., 2014). Interestingly, recent studies have indicated that early cultivars of Japanese apricot contained less ABA during dormancy than late cultivars (Wen et al., 2016), thus suggesting a dose-dependent control of dormancy. Interestingly, a close relationship between ABA and ROS has been shown not only during stomatal closure but also for seed dormancy. Notably, exogenous ROS application diminished ABA concentration in barley seeds during the after-ripening period (Wang et al., 1998), and increased its catabolism

by up-regulating *CYP707A* genes in *Arabidopsis* during seed imbibition (Liu et al., 2010). Moreover, treatment of sunflower seeds during this after-ripening period enhances ROS production (Oracz et al., 2007), similarly to many studies including HC treatment on bud in various species. Thus, even though no studies have demonstrated these connections of ROS and ABA in buds, they are well known in various seed tissues. Therefore, as proposed by Leida et al. (2012), similar mechanisms may occur in bud dormancy. More precisely, we may compare the seed after-ripening period with bud endodormancy stage, while the imbibition process in seed may be similar to the ecodormancy period in buds. Nevertheless, the effect of ABA on bud dormancy is still not entirely understood, and ABA may control growth inhibition rather than play a direct role on dormancy regulation as suggested by Ramina et al. (1995) when they did not identify any strict relationship between ABA quantity and dormancy release in peach buds. Sensitivity to ABA may fluctuate as well, as shown in dormant pea seedling, where ROS inhibits the ABA signaling pathway during the imbibition period (Meinhard and Grill, 2001; Barba-Espin et al., 2010).

Gibberellic acids are particularly important as they may act in the growth renewal process during dormancy release. In fruit trees, several studies pointed out their implication in the control of dormancy progression, although few studies quantified them directly, but focused on their metabolism and on the effect of exogenous application. GA application may even substitute for chilling (Brown et al., 1960; Saure, 1985; Reinoso et al., 2002; Rinne et al., 2011; Zhuang et al., 2013) and GAs synthesis is promoted by dormancy breaking reagents (Seif El-Yazal et al., 2014). Nevertheless, the highest levels of GA₁ and GA₃ were found in dormant buds during endodormancy release and diminished afterwards (Luna et al., 1990; Wen et al., 2016). Overall, this is supported by expression analyses, with the up-regulation of *GA3-oxidase* (*GA3ox*) and *GA20-oxidase* (*GA20ox*), responsible for bioactive GA synthesis, under chilling treatment (Rinne et al., 2011) or around dormancy release (Bai et al., 2013; Wen et al., 2016). *GA2-oxidase* (*GA2ox*) genes, which encode the enzymes responsible for the deactivation of bioactive GA₄ and GA₁, are upregulated during dormancy and dormancy release in Japanese apricot buds (Yamane et al., 2008) but during ecodormancy as well in Japanese pear (Bai et al., 2013). Thus it appears that GAs regulation is tightly balanced between production and degradation, and they might enhance growth rate when the conditions are favorable. Interestingly, endogenous ROS application enhances endogenous GA concentration in *Arabidopsis* seed (Bahin et al., 2011) through diminution of its catabolism, and conversely GA₄ application in apricot flower buds led to the development of oxidative stress and subsequent dormancy release (Zhuang et al., 2013). Thus there is obviously a tight link between ROS and GA, both influencing each other.

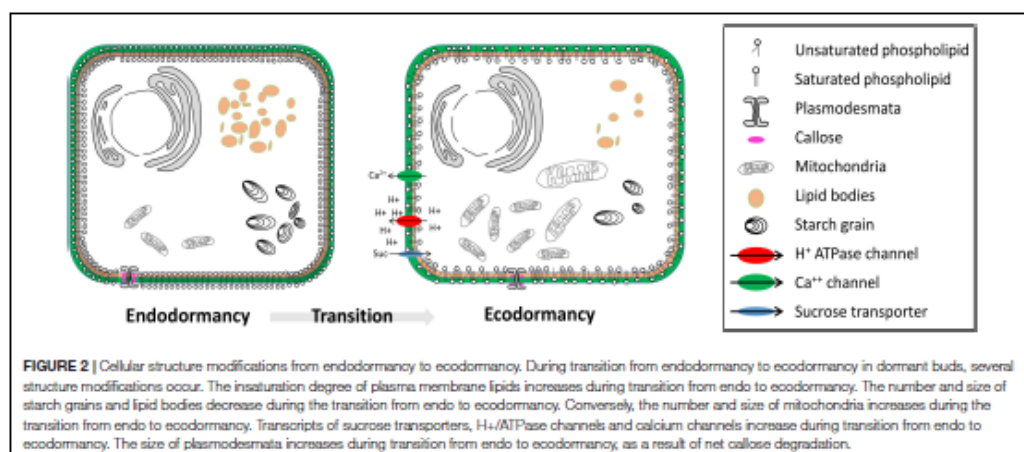
Taken as a whole, we can postulate that, similarly to seed dormancy, the hormonal balance between ABA and GA, which promotes dormancy and growth, respectively, may mediate the decision toward bud break, and as stated previously for different hormonal studies. Furthermore, as shown for the interaction between ethylene and ABA, ethylene modulating ABA degradation and signaling (Zheng et al., 2015), all hormonal

pathways are interconnected and act together to control dormancy progression this balance may be directly influenced by ROS content, notably through redox control of the activity and symplasmic and apoplastic transport of plant growth regulator or transcriptions factors (Considine and Considine, 2016).

PLASMA MEMBRANE AND CELL WALL MODIFICATIONS

On another scale, modifications of membrane structure may be influenced by ROS concentration, or may be responsible for changing metabolism and thus may enhance ROS production. For example, O₂ diffusion through membranes may be more effective just before endodormancy release, inducing metabolism activity and then the increase of ROS production. On the other hand, as proposed above, ROS production may be caused by hypoxia. It is therefore essential to understand whether membrane modifications induce ROS production by raising metabolism as oxygen is more available, or if oxygen shortage generates ROS (Turrens, 2003). Molecular and metabolic changes associated with seasonal cycle of dormancy have been studied extensively in trees but structural changes at the cell level were less examined. Cells are organized in different compartments that enable their normal functioning. These compartments are delimited by membranes that are bilayers of complex lipids, partly permeable, associated with proteins (Figure 2). The stability of the membranes under cold stress highly depends on their functional and structural characteristics therefore the role of its components, lipids and proteins, is crucial. During winter, both dormancy and cold acclimation modify the cell structure and the two processes are usually difficult to separate. The lipid composition and membranous factors are modified during dormancy, notably to protect the cells from freezing-induced dehydration and lesions (Wang and Faust, 1990; Uemura and Steponkus, 1999). For example, it has been shown that the fluidity of the plasma membranes of bud cells in peach increases with chilling during dormancy release (Portrat et al., 1995), associated with a marked increase in total phospholipid content and in the relative level of linolenic acid (C18:3) (Erez et al., 1997). Moreover, low temperatures or thidiazuron, a growth regulator, increases the degree of unsaturation of fatty acids in the membrane lipids of apple buds, changes the polar head group composition, and changes sterol levels and composition (Wang and Faust, 1988, 1990). In addition, triggering dormancy release by GA₄ application further confirmed that the composition in linoleic and linolenic acids are modified during dormancy progression (Zhuang et al., 2015).

Thus, winter cold temperatures lead to modifications in the membrane state as part of the cold acclimation process but also potentially the dormancy state. Nevertheless, no studies have been undertaken concerning the global lipid composition during the dormancy period with a lack of chilling, thus allowing a better understanding of the role of lipids over winter and spring rest. Studies investigating ultrastructure changes during dormancy are still rare but exceptions includes: plasmodesmata and lipid droplets analyses (Rinne and van der Schoot, 2004;



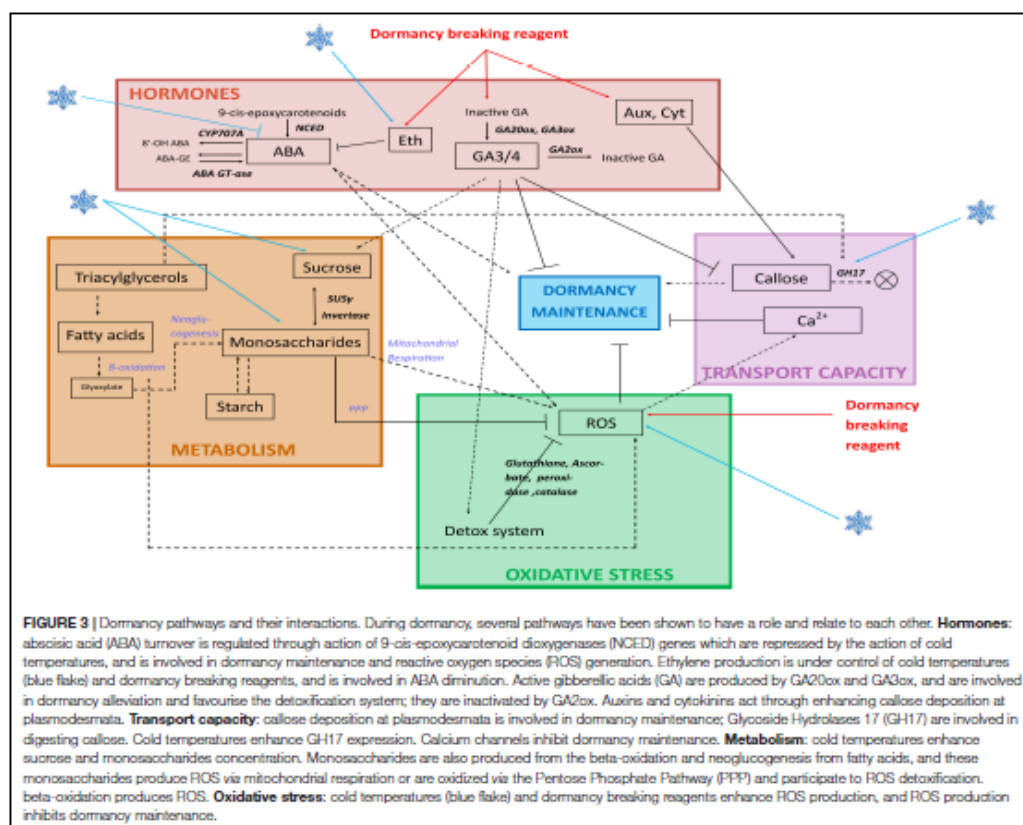
Rinne et al., 2011; Paul et al., 2014) and cell wall thickening and an increase in vacuole precipitates during dormancy induction (Jian et al., 1997). Currently, no study has shown a direct relationship between ROS signaling and membrane modification in bud dormancy but analyses on seed germination have shown that hydroxyl radical $OH\cdot$ had a direct role on degradation involved in cell wall loosening (Müller et al., 2009). Therefore, we can hypothesize that ROS signaling may be involved in downstream cell wall loosening during bud dormancy release and growth resumption.

ROLE OF MEMBRANE BOUND TRANSPORTERS

Apart from the changes in the saturation level of the lipids and types of lipids, other properties of the membranes are modified over dormancy progression (Figure 2). In particular, movements through the plasma membrane and long-distance transport change in response to chilling. In peach for example, active absorption of sucrose and other nutrients is stopped when the bud is in a state of deep dormancy while an active sucrose import was observed during growth resumption (Marquat et al., 1996). These modifications in cotransport H^+ /sucrose can be explained by structural changes of the plasma membrane (Wisniewski and Ashworth, 1986; Portrat et al., 1995), and more specifically by changes in ATPases activity (Giaquinta, 1979) (Figure 2). Plasma membrane H^+ extrusion pumps (PM H^+ ATPases) are key players in transport activity through their role in energizing solute transport (Alves et al., 2001) and studies revealed that H^+ ATPases accumulation and activity are inhibited during endodormancy (Aue et al., 2000) but increase during endodormancy release or ecodormancy in peach (Gévaudant et al., 2001), walnut (Alves et al., 2007), and pear (Liu et al., 2012) (Figure 2). In the same time, the hydric status of buds varies characteristically with a marked dehydration in

endodormancy and a water content increase in ecodormancy, just before budburst (Rinne et al., 1994; Yooyongwech et al., 2009; Götz et al., 2014; Kaufmann and Blanke, 2017). Water content was reported to increase in peach buds after a treatment with HC, a dormancy-breaking agent, suggesting that not only cold regulates the hydric status (Yooyongwech et al., 2012). The water status in buds is controlled by a range of membrane bound channels like aquaporins. Transcripts for two aquaporins showed differential spatiotemporal patterns in dormant peach buds in an interesting study by Yooyongwech et al. (2008). Their observations revealed that the activation of inter- and intra-cell communication through aquaporins resulted in a gradual increase in water content before growth resumption, which occurs earlier in low-chill cultivars than in high-chill cultivars.

Furthermore, connections between cells and organs over dormancy progression rely on the plasmodesmata functioning for carbohydrate and nutrient supply as well as signaling molecules. Plasmodesmata are not only essential for cell-to-cell transport, thus crucial for the bud functioning during dormancy, but they also control the supply route through the phloem between the buds and the shoot. Consequently, modifications of the transport activity by obstruction of the plasmodesmata system lead to growth cessation, dormancy onset and dormancy release (Rinne and van der Schoot, 1998; Rinne et al., 2001; Xu et al., 2016). In their exhaustive review on plasmodesmata, Rinne and van der Schoot (2003) demonstrated the key role of plasmodesmata activity for symplasmic uncoupling and recoupling of vegetative bud cells during dormancy onset and dormancy release, respectively. In dormancy-inducing conditions, several studies have shown that callose (1,3- β -D-glucan) is deposited at the bottleneck region of plasmodesmata leading to diminished, if not stopped, transport and signaling between cells (Rinne et al., 2001). Net callose deposition is governed by the joint action of 1,3- β -glucan synthases and 1,3- β -glucanases (glucan hydrolase family 17, GH17), and shifts in



the balance of these enzymes are central to the dormancy status and the growth potential of buds. Rinne et al. (2001, 2011) have hypothesized that the balance shifted toward net deposition as long as endodormancy lasts. Subsequently, during chilling-induced dormancy release, blocked plasmodesmata connections are restored within the bud by callose degradation. GAs seem to be implicated in the up-regulation of specific 1,3- β -glucanases involved in orchestrating the chilling-induced callose breakdown to restore symplastic connections after endodormancy release (Rinne et al., 2011). By focusing on the ultra-structure of plasmodesmata Rinne et al. (2001) have shown that lipid bodies are targeted to the plasma membrane in close proximity to the plasmodesmata and may facilitate the restoration of plasmodesmata functionality (Rinne et al., 2011). Lipid droplets are membrane-bound storage organelles of universal occurrence. Recent analyses have suggested their role as signaling platforms that deliver proteins and signaling molecules (Murphy, 2012). In plants, they have been described as globules containing neutral lipids, triglycerids (TAG) or sterol esters, delimited by a phospholipid monolayer (Farese and Walther, 2009; Chapman

et al., 2012). van der Schoot et al. (2011) and Paul et al. (2014) have hypothesized that in buds, lipid bodies function as a vehicle that delivers proteins to the plasmodesmata, including 1,3- β -glucanases to the callose deposits in order to restore plasmodesmata function (Rinne et al., 2011). Overall, explaining the establishment and release of dormancy by the dynamics of callose and plasmodesmata is tempting but genetic and molecular evidence to support this hypothesis are still lacking and causality remains unproven. Recently, observations on spruce embryonic shoots have revealed that callose was still detected in plasmodesmata during ecodormancy (Guzicka et al., 2017). Furthermore, recent studies on architecture and permeability of plasmodesmata have shed light on the fine mechanisms regulating cell-to-cell connectivity. They show that, although callose is a central regulator of plasmodesmata, it does not necessarily mediate all changes to connectivity and to the size exclusion limit (SEL) for the molecules (Tilsner et al., 2016; Nicolas et al., 2017).

To our knowledge, no published study has uncovered interactions between ROS signaling and intercellular transport

during bud dormancy. However, these links have been firmly suggested in other systems. For example, *Nicotiana benthamiana* mutants exhibiting increased production of ROS also displayed higher plasmodesmal transport (Stonebloom et al., 2012). In *Arabidopsis*, a study measuring root cell permeability also supports the hypothesis that ROS amounts regulate plasmodesmata function: application of low concentrations of H_2O_2 increased plasmodesmata permeability whereas high H_2O_2 concentrations induced plasmodesmata closure (Rutschow et al., 2011). These results suggest that ROS may participate in promoting the formation and alteration of plasmodesmata, or callose deposit, thus controlling communication and transport. Rutschow et al. (2011) speculate that this signaling is linked to differential stress response: low amounts of ROS indicate mild stresses that might be mitigated by increased cellular transport while the response to extreme stresses revealed by acute ROS signals necessitates cellular isolation. For bud tissues, the question here is therefore which amount of ROS is produced during dormancy progression and release and how this signal is transduced for cellular transport.

CONCLUSION

Oxidative stress, carbohydrates metabolism highly linked to the mitochondrial respiration, hormones and transport capacity associated to plasma membrane and cell wall properties have been shown to play important roles in bud dormancy process. As these pathways interact between them, dormancy mechanism is very complex. The main pathways involved in bud dormancy are synthesized in Figure 3. Overall, these studies highlight the pivotal role of ROS production and detoxification systems for dormancy release. As a consequence of a combination of stresses

and the decrease of cell metabolism, dormant buds accumulate ROS and their removal by scavenging and detoxification systems seems to be associated with breaking of dormancy. Implication of these mechanisms is further validated by the action of HC, potentially linked to the generation of sub-lethal oxidation stress. The question remains whether slow accumulation of ROS, as a consequence of winter temperatures and low metabolism, triggers dormancy release when a sub-lethal threshold is reached, or a prompt shift into stress-inducible conditions leads to a dormancy-alleviating response. In this case, the whole concept of chilling requirements could be questioned. Further studies are necessary to address these hypotheses, including the question of toxicity of dormancy-breaking treatments, in relation to ROS production.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RB, BW, and ED designed the manuscript. RB and BW wrote the manuscript. BW and ED critically evaluated the manuscript.

FUNDING

This work was supported by INRA and Aquitaine Region (AQUIPRU project 2014-1R20102-2971) for financing doctoral fellowships to RB.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank INRA and the Aquitaine Region for finding the financing doctoral fellowships to RB.

REFERENCES

- Aloni, R., Baum, S. F., and Peterson, C. A. (1990). The role of cytokinin in sieve tube regeneration and callose production in wounded coleus internodes 1. *Plant Physiol.* 93, 982–989. doi: 10.1071/PP9930601
- Alves, G., Améglio, T., Guillot, A., Julien, J. L., Pétel, G., and Fleurat-Lessard, P. (2001). Cytological and immunological approach of vessel-associated cells in understanding the winter sugar exchanges, in walnut stems. *Acta Hort.* 544, 295–300. doi: 10.17660/ActaHortic.2001.544.38
- Alves, G., Decourteix, M., Fleurat-Lessard, P., Sakr, S., Bonhomme, M., Améglio, T., et al. (2007). Spatial activity and expression of plasma membrane H^+ -ATPase in stem xylem of walnut during dormancy and growth resumption. *Tree Physiol.* 27, 1471–1480. doi: 10.1093/treephys/27.10.1471
- Amooaghaie, R., and Ahmadi, F. (2017). Triangular interplay between ROS, ABA and GA in dormancy alleviation of *Bunium persicum* seeds by cold stratification. *Russ. J. Plant Physiol.* 64, 588–599. doi: 10.1134/S1021443717040021
- Anderson, J. V., Horvath, D. P., Chao, W. S., and Foley, M. E. (2010). "Bud dormancy in perennial plants: a mechanism for survival," in *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, eds E. Lubzens, J. Cerda, and M. Clark (Berlin: Springer), 69–90. doi: 10.1007/978-3-642-12422-8_5
- Arc, E., Galland, M., Cuff, G., Godin, B., Lounif, L., Job, D., et al. (2011). Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: how quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. *Proteomics* 11, 1606–1618. doi: 10.1002/pmic.201000641
- Aue, H.-L., Lecomte, I., and Pétel, G. (2000). Changes in parameters of the plasmalemma ATPase during peach vegetative bud dormancy. *Biol. Plant.* 43, 25–29. doi: 10.1023/A:1026538526649
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbinau, F., and Leymarie, J. (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 34, 980–993. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x
- Bai, S., Saito, T., Sakamoto, D., Fujii, H., and Moriguchi, T. (2013). Transcriptome analysis of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) flower buds transitioning through endodormancy. *Plant Cell Physiol.* 54, 1132–1151. doi: 10.1093/pcp/ptc067
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., et al. (2010). Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environ.* 33, 981–994. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02120.x
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 49883–49888. doi: 10.1074/jbc.M408918200
- Bartolini, S., Vitagliano, C., Cinelli, F., and Scalabrelli, G. (1996). Effect of hydrogen cyanamide on apricot bud break and catalase activity. *Acta Hort.* 441, 159–166.
- Bartolini, S., Zanol, G. C., and Viti, R. (2006). Changes in antioxidant compounds in flower buds of two apricot cultivars during winter season. *Acta Hort.* 701, 69–74. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.701.7

- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Fan, S., Reighard, G. L., Scorza, R., and Abbott, A. G. (2004). A deletion affecting several gene candidates is present in the evergrowing peach mutant. *J. Hered.* 95, 436–444. doi: 10.1093/jhered/esh057
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. L., et al. (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 Genet. Genomes* 4, 495–507. doi: 10.1007/s11295-007-0126-9
- Bohlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., et al. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312, 1040–1043. doi: 10.1126/science.1126038
- Bonhomme, M., Rageau, R., and Gendraud, M. (2000). Influence of temperature on the dynamics of ATP, ADP and non-adenylic triphosphate nucleotides in vegetative and floral peach buds during dormancy. *Tree Physiol.* 20, 615–621. doi: 10.1093/treephys/20.9.615
- Brown, D., Griggs, W., and Iwakiri, B. (1960). The influence of gibberellin on resting pear buds. *Proc. Am. Soc. Hortic.* 76, 52–58.
- Chao, W. S., Dogramaci, M., Horvath, D. P., Anderson, J. V., and Foley, M. E. (2017). Comparison of phytohormone levels and transcript profiles during seasonal dormancy transitions in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Mol. Biol.* 94, 281–302. doi: 10.1007/s11103-017-0607-7
- Chapman, E., Wright, L. C., and Raison, J. K. (1979). Seasonal changes in the structure and function of mitochondrial membranes of artichoke tubers. *Plant Physiol.* 63, 363–366. doi: 10.1104/pp.63.2.363
- Chapman, K. D., Dyer, J. M., and Mullens, R. T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. *J. Lipid Res.* 53, 215–226. doi: 10.1194/jlr.R021436
- Charrier, G., Chuine, I., Bonhomme, M., and Ameglio, T. (2017). Assessing frost damages using dynamic models in walnut trees: exposure rather than vulnerability controls frost risks. *Plant Cell Environ.* 41, 1008–1021. doi: 10.1111/pce.12935
- Considine, M. J., and Considine, J. A. (2016). On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 3189–3203. doi: 10.1093/jxb/erw138
- Considine, M. J., Diaz-Vivancos, P., Kerchev, P., Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Gibbs, D. J., et al. (2017). Learning to breathe: developmental phase transitions in oxygen status. *Trends Plant Sci.* 22, 140–153. doi: 10.1016/j.tplants.2016.11.013
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326. doi: 10.1089/ars.2013.5665
- Cooke, J. E., Eriksson, M. E., and Junttila, O. (2012). The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ.* 35, 1707–1728. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x
- Davies, D. R., Bindschell, L. V., Strickland, T. S., and Bolwell, G. P. (2006). Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *J. Exp. Bot.* 57, 1817–1827. doi: 10.1093/jxb/erj216
- Davies, P. J. (2013). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Del Cueto, J., Ionescu, I. A., Pičmanová, M., Gericke, O., Motawia, M. S., Olsen, C. E., et al. (2017). Cyanogenic glucosides and derivatives in almond and sweet cherry flower buds from dormancy to flowering. *Front. Plant Sci.* 8:800. doi: 10.3389/fpls.2017.00800
- Dieuouide, M., Brouquisse, R., Pradet, A., and Raymond, P. (1992). Increased Fatty Acid β -Oxidation after glucose starvation in maize root tips. *Plant Physiol.* 99, 595–600. doi: 10.1104/pp.99.2.595
- Dogramaci, M., Foley, M. E., Chao, W. S., Christoffers, M. J., and Anderson, J. V. (2013). Induction of endodormancy in crown buds of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) implicates a role for ethylene and cross-talk between photoperiod and temperature. *Plant Mol. Biol.* 81, 577–593. doi: 10.1007/s11103-013-0026-3
- Einai, A., and Valizadeh, J. (2017). Storage reserve mobilization, gluconeogenesis, and oxidative pattern in dormant pistachio (*Pistacia vera* L.) seeds during cold stratification. *Trees* 31, 659–671. doi: 10.1007/s00468-016-1498-y
- El Kayal, W., Allen, C. C., Ju, C. J., Adams, E., King-Jones, S., Zaharia, I. I., et al. (2011). Molecular events of apical bud formation in white spruce *Picea glauca*. *Plant Cell Environ.* 34, 480–500. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02257.x
- El-Shereif, A. R., Mizutani, F., Ongaso, J. M., and Sharif Hossain, A. B. M. (2006). Influence of different temperatures on bud break and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of young peach trees. *Acta Physiol. Plant.* 28, 459–463. doi: 10.1007/BF02706629
- Erex, A., Wang, S. Y., and Faust, M. (1997). Lipids in peach buds during dormancy, a possible involvement in dormancy control. *Adv. Hortic. Sci.* 11, 128–132.
- Farese, R. V., and Walther, T. C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855–860. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.005
- Felker, F. C., Robitaille, H. A., and Hess, F. D. (1983). Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds. *Am. J. Bot.* 70, 376–386. doi: 10.2307/2443246
- Fennell, A. Y., Schlauch, K. A., Gouthu, S., Deluc, L. G., Khadka, V., Sreekantan, L., et al. (2015). Short day transcriptomic programming during induction of dormancy in grapevine. *Funct. Plant Ecol.* 6:834. doi: 10.3389/fpls.2015.00834
- Gévaudant, F., Pétel, G., and Guillot, A. (2001). Differential expression of four members of the H⁺-ATPase gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. *Planta* 212, 619–626. doi: 10.1007/s004250000438
- Giaquinta, R. T. (1979). Phloem Loading of Sucrose. *Plant Physiol.* 63, 744–748. doi: 10.1104/pp.63.4.744
- Götz, K.-P., Chmielewski, F.-M., Homann, T., Huschek, G., Matzner, P., and Rawel, H. M. (2014). Seasonal changes of physiological parameters in sweet cherry (*Prunus avium* L.) buds. *Sci. Hortic.* 172, 183–190. doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.012
- Guak, S., and Fuchigami, L. H. (2001). Effects of applied ABA on growth cessation, bud dormancy, cold acclimation, leaf senescence and N mobilization in apple nursery plants. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 459–464. doi: 10.1080/14620316.2001.11511394
- Guzicka, M. (2001). Changes in starch distribution within an embryonic shoot of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] before resumption of mitotic activity. *Dendrobiology* 46, 27–31.
- Guzicka, M., Pawłowski, T. A., Staszak, A., Rożkowski, R., and Chmura, D. J. (2017). Molecular and structural changes in vegetative buds of Norway spruce during dormancy in natural weather conditions. *Tree Physiol.* doi: 10.1093/treephys/tpx156 [Epub ahead of print].
- Halaly, T., Pang, X., Batkoff, T., Crane, O., Keren, A., Venkateswari, J., et al. (2008). Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* 228, 79–88. doi: 10.1007/s00425-008-0720-6
- Hao, X., Chao, W., Yang, Y., and Horvath, D. (2015). Coordinated expression of FLOWERING LOCUS T and DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX-Like genes in Leafy Spurge. *PLoS One* 10:e0126030. doi: 10.1371/journal.pone.0126030
- Hao, X., Yang, Y., Yue, C., Wang, L., Horvath, D. P., and Wang, X. (2017). Comprehensive transcriptome analyses reveal differential gene expression profiles of *Camellia sinensis* axillary buds at para-, endo-, ecodormancy, and bud flush stages. *Front. Plant Sci.* 8:553. doi: 10.3389/fpls.2017.00553
- Horvath, D. P., Chao, W. S., Suttle, J. C., Thimmapuram, J., and Anderson, J. V. (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. doi: 10.1186/1471-2164-9-536
- Howe, G. T., Horvath, D. P., Dharmawardhana, P., Priest, H. D., Mockler, T. C., and Strauss, S. H. (2015). Extensive transcriptome changes during natural onset and release of vegetative bud dormancy in *Populus*. *Funct. Plant Ecol.* 6:989. doi: 10.3389/fpls.2015.00989
- Hsu, C.-Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., et al. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10756–10761. doi: 10.1073/pnas.1104713108
- Huang, X., Zhu, W., Dai, S., Gai, S., Zheng, G., and Zheng, C. (2008). The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Planta* 228, 545–552. doi: 10.1007/s00425-008-0757-6
- Hussain, S., Niu, Q., Yang, F., Hussain, N., and Teng, Y. (2015). The possible role of chilling in floral and vegetative bud dormancy release in *Pyrus pyrifolia*. *Biol. Plant.* 59, 726–734. doi: 10.1007/s10535-015-0547-5
- Ionescu, I. A., López-Ortega, G., Burrow, M., Bayo-Cañha, A., Junge, A., Gericke, O., et al. (2017). Transcriptome and metabolite changes during

- hydrogen cyanamide-induced floral bud break in sweet cherry. *Front. Plant Sci.* 8:1233. doi: 10.3389/fpls.2017.01233
- Jian, L., Li, P. H., Sun, L., and Chen, T. H. (1997). Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca²⁺ in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J. Exp. Bot.* 48, 1195–1207. doi: 10.1093/jxb/48.6.1195
- Jiménez, S., Reighard, G. L., and Bielenberg, D. G. (2010). Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Mol. Biol.* 73, 157–167. doi: 10.1007/s11103-010-9608-5
- Kaufmann, H., and Blanke, M. (2017). Changes in carbohydrate levels and relative water content (RWC) to distinguish dormancy phases in sweet cherry. *J. Plant Physiol.* 218, 1–5. doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.004
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* 21, 829–837. doi: 10.1007/s00299-003-0591-z
- Kocay, G., von Ballmoos, P., Rüeggsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., and Brunold, C. (2001). Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol.* 127, 1147–1156. doi: 10.1104/pp.010107
- Koussa, T., Broquedis, M., and Bouard, J. (1994). Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la phase de levée de dormance. *Vitis* 33, 63–67.
- Kuroda, H., Sugiura, T., and Ito, D. (2002). Changes in hydrogen peroxide content in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in relation to breaking of endodormancy. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 71, 610–616. doi: 10.2503/jjhs.71.610
- Kuroda, H., Sugiura, T., and Sugiura, H. (2005). Effect of Hydrogen peroxide on breaking endodormancy in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 74, 255–257. doi: 10.2503/jjhs.74.255
- Lang, G., Early, J., Martin, G., and Darnell, R. (1987). Endo-, para-, and eodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience* 22:377.
- Le Bris, M., Michaux-Ferrière, N., Jacob, Y., Poupet, A., Barthe, P., Guignon, J.-M., et al. (1999). Regulation of bud dormancy by manipulation of ABA in isolated buds of *Rosa hybrida* cultured in vitro. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 273–281. doi: 10.1071/PP98133
- Leida, C., Conejero, A., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2012). Chilling-Dependent release of seed and bud dormancy in peach associates to common changes in gene expression. *PLoS One* 7:e35777. doi: 10.1371/journal.pone.0035777
- Leida, C., Terol, J., Martí, G., Agustí, M., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2010). Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiol.* 30, 655–666. doi: 10.1093/treephys/tpq008
- Li, J., Xu, Y., Niu, Q., He, L., Teng, Y., and Bai, S. (2018). Abscissic Acid (ABA) promotes the induction and maintenance of Pear (*Pyrus pyrifolia* White Pear Group) flower bud endodormancy. *Int. J. Mol. Sci.* 19:E310. doi: 10.3390/ijms19010310
- Li, Z., Reighard, G. L., Abbott, A. G., and Bielenberg, D. G. (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, 3521–3530. doi: 10.1093/jxb/erp195
- Liu, B., Zhang, N., Wen, Y., Jin, X., Yang, J., Si, H., et al. (2015). Transcriptomic changes during tuber dormancy release process revealed by RNA sequencing in potato. *J. Biotechnol.* 198, 17–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.019
- Liu, B., Zhao, S., Tan, F., Zhao, H., Wang, D., Si, H., et al. (2017). Changes in ROS production and antioxidant capacity during tuber sprouting in potato. *Food Chem.* 237, 205–213. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.107
- Liu, G., Li, W., Zheng, P., Xu, T., Chen, L., Liu, D., et al. (2012). Transcriptomic analysis of 'Suli' pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) buds during the dormancy by RNA-Seq. *BMC Genomics* 13:700. doi: 10.1186/1471-2164-13-700
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., and Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61, 2979–2990. doi: 10.1093/jxb/erq125
- Luna, V., Lorenzo, E., Reinoso, H., Tordable, M. C., Abdala, G., Pharis, R. P., et al. (1990). Dormancy in Peach (*Prunus persica* L.) flower buds: I. Floral morphogenesis and endogenous gibberellins at the end of the dormancy period. *Plant Physiol.* 93, 20–25. doi: 10.1104/pp.93.1.20
- Marquart, C., Petel, G., and Gendraud, M. (1996). Study of H⁺-nutrient co-transport in peach-tree and the approach to their involvement in the expression of vegetative bud growth capability. *J. Plant Physiol.* 149, 102–108. doi: 10.1016/S0176-1617(96)80180-5
- Meinhard, M., and Grill, E. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 508, 443–446. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03106-4
- Meihta, K., Agudelo-Romero, P., Signorelli, S., Gibbs, D. J., Considine, J. A., Foyer, C. H., et al. (2018). Developmental control of hypoxia during bud burst in grapevine. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.13141 [Epub ahead of print].
- Meihta, K., Konnerup, D., Colmer, T. D., Considine, J. A., Foyer, C. H., and Considine, M. J. (2015). Spatio-temporal relief from hypoxia and production of reactive oxygen species during bud burst in grapevine (*Vitis vinifera*). *Ann. Bot.* 116, 703–711. doi: 10.1093/aob/mcv123
- Mielke, E. A., and Dennis, F. G. (1978). Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). III. Effects of leaves, defoliation and temperature on levels of abscisic acid in flower primordia. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 103, 446–449.
- Mimida, N., Saito, T., Moriguchi, T., Suzuki, A., Komori, S., and Wada, M. (2015). Expression of DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)-like genes in apple. *Biol. Plant.* 59, 237–244. doi: 10.1007/s10535-015-0503-4
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoel, K., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R. A., Fry, S. C., Krieger-Liszczay, A., and Leubner-Metzger, G. (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cross seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* 150, 1855–1865. doi: 10.1104/pp.109.139204
- Murcia, G., Pontin, M., Reinoso, H., Baraldi, R., Bertazza, G., Gómez-Talquencia, S., et al. (2015). ABA and GA3 increase carbon allocation in different organs of grapevine plants by inducing accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, enhancement of phloem area and expression of sugar transporters. *Physiol. Plant.* 156, 323–337. doi: 10.1111/pp.12390
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541–585. doi: 10.1007/s00709-011-0329-7
- Nee, C.-C., and Fuchigami, L. H. (1992). Overcoming rest at different growth stages with hydrogen cyanamide. *Sci. Hortic.* 50, 107–113. doi: 10.1016/S0304-4238(05)80013-5
- Nicolas, W. J., Grison, M. S., Trépo, S., Gaston, A., Fouché, M., Cordelières, F. P., et al. (2017). Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nat. Plants* 3:17082. doi: 10.1038/nplants.2017.82
- Oncelay, C. Y., Daley, L. S., Vines, H. M., Couvillon, G. A., and Hendershott, C. H. (1979). Seasonal fluctuation in malate dehydrogenase, phosphatase and proteinase activity of dormant peach flower buds. *Sci. Hortic.* 11, 229–239. doi: 10.1016/0304-4238(79)90004-9
- Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D., et al. (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol. Biol.* 71, 403–423. doi: 10.1007/s11103-009-9531-9
- Or, E., Vilozy, I., Eyal, Y., and Ogrudovitch, A. (2000). The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Mol. Biol.* 43, 483–494. doi: 10.1023/A:1006450516982
- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J. M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., et al. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation: dormancy in sunflower seeds. *Plant J.* 50, 452–465. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.03063.x
- Oracz, K., and Karpinski, S. (2016). Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Front. Plant Sci.* 7:864. doi: 10.3389/fpls.2016.00864
- Orfer, C. J., and Goussard, P. G. (1980). Effect of hot-water treatments on budburst and rooting of grapevine cuttings. *Vitis* 19, 1–3.

- Parada, F., Noriega, X., Dantas, D., Bressan-Smith, R., and Pérez, F. J. (2016). Differences in respiration between dormant and non-dormant buds suggest the involvement of ABA in the development of endodormancy in grapevines. *J. Plant Physiol.* 201, 71–78. doi: 10.1016/j.jplph.2016.07.007
- Park, J.-Y., Canam, T., Kang, K.-Y., Ueda, F., and Mansfield, S. D. (2009). Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology. *Tree Physiol.* 29, 937–946. doi: 10.1093/treephys/tpq028
- Paul, L. K., Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2014). Shoot meristems of deciduous woody perennials: self-organization and morphogenetic transitions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 86–95. doi: 10.1016/j.pbi.2013.11.009
- Pérez, F. J., and Burgos, B. (2004). Alterations in the pattern of peroxidase isoenzymes and transient increases in its activity and in H₂O₂ levels take place during the dormancy cycle of grapevine buds: the effect of hydrogen cyanamide. *Plant Growth Regul.* 43, 213–220. doi: 10.1023/B:GROW.0000046003.33194.ac
- Pérez, F. J., and Lira, W. (2005). Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. *J. Plant Physiol.* 162, 301–308. doi: 10.1016/j.jplph.2004.07.011
- Pérez, F. J., Vergara, R., and Or, E. (2009). On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul.* 59, 145–152. doi: 10.1007/s10725-009-9397-5
- Pérez, F. J., Vergara, R., and Rubio, S. (2008). H₂O₂ is involved in the dormancy-breaking effect of hydrogen cyanamide in grapevine buds. *Plant Growth Regul.* 55, 149–155. doi: 10.1007/s10725-008-9269-4
- Pfeiffer, W., and Hoffberger, M. (2001). Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells. *Physiol. Plant.* 111, 144–150. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110203.x
- Piola, F., Label, P., Vergne, P., Aderkas, P., and von Rohr, R. (1998). Effects of endogenous ABA levels and temperature on cedar (*Cedrus libani* Loudon) bud dormancy in vitro. *Plant Cell Rep.* 18, 279–283. doi: 10.1007/s002990050571
- Porto, D. D., Bruneau, M., Perini, P., Anzanello, R., Renou, J.-P., dos, et al. (2015). Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for FLC-like genes. *J. Exp. Bot.* 66, 2659–2672. doi: 10.1093/jxb/erv061
- Portrat, K., Mathieu, C., Motta, C., and Pétel, G. (1995). Changes in plasma membrane properties of peach tree buds and stands during dormancy. *J. Plant Physiol.* 147, 346–350. doi: 10.1016/S0176-1617(11)82165-6
- Pouget, R. (1965). Action de la chlorpromazine sur la dormance de la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Ann. Physiol. Vég.* 7, 273–282.
- Prassinis, C., Rigas, S., Kizis, D., Vlahou, A., and Hatzopoulos, P. (2011). Subtle proteome differences identified between post-dormant vegetative and floral peach buds. *J. Proteomics* 74, 607–619. doi: 10.1016/j.jpro.2011.01.018
- Ramona, A., Colauzzi, M., Masia, A., Pitacco, A., Caruso, T., Messina, R., et al. (1995). Hormonal and climatological aspects of dormancy in peach buds. *Acta Hort.* 395, 35–46. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.395.3
- Regier, N., Streh, S., Zeeman, S. C., and Frey, B. (2010). Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* × *nigra* cv. Dorakamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. *Tree Physiol.* 30, 979–987. doi: 10.1093/treephys/tpq047
- Reinoso, H., Luna, V., Dauria, C., Pharis, R., and Bottini, R. (2002). Dormancy in peach (*Prunus persica*) flower buds. VI. Effects of gibberellins and an acylcyclohexanediol (trinexapac-ethyl) on bud morphogenesis in field experiments with orchard trees and on cuttings. *Can. J. Bot.* 80, 664–674. doi: 10.1139/B02-051
- Rinne, P., Tuominen, H., and Juntila, O. (1994). Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Betula pubescens*. *Tree Physiol.* 14, 549–561. doi: 10.1093/treephys/14.6.549
- Rinne, P. L., Kaikuranta, P. M., and van der Schoot, C. (2001). The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J.* 26, 249–264. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2001.01022.x
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 125, 1477–1485.
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2003). Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense. *Can. J. Bot.* 81, 1182–1197. doi: 10.1139/b03-123
- Rinne, P. L., and van der Schoot, C. (2004). Cell-cell communication as a key factor in dormancy cycling. *J. Crop Improv.* 10, 113–156. doi: 10.1300/J411v10n01
- Rinne, P. L., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjärvi, J., et al. (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1, 3-β-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell* 23, 130–146. doi: 10.1105/tpc.110.081307
- Rios, G., Conejero, A., Leida, C., Petri, C., Burgos, L., and Badenes, M. L. (2014). "Functional characterization of a SAP protein expressed in dormant buds of peach," in *Proceedings of the 7th International Rosaceae Genomics Conference*, Washington, DC, 20.
- Rodríguez, A., and Sánchez-Tamés, R. (1986). Dormancy and seasonal changes of plant growth regulators in hazel buds. *Physiol. Plant.* 66, 288–292. doi: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb02422.x
- Rodríguez, A. J., Sherman, W. B., Scorza, R., Wisniewski, M., and Okie, W. R. (1994). Evergreen Peach, its inheritance and dormant behavior. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 789–792.
- Rodríguez-Gacio Mdol, C., Matilla-Vázquez, M. A., and Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal. Behav.* 4, 1035–1048. doi: 10.4161/psb.4.11.9902
- Rohde, A., Ruttink, T., Hostyn, V., Sterck, L., Van Driessche, K., and Boerjan, W. (2007). Gene expression during the induction, maintenance, and release of dormancy in apical buds of poplar. *J. Exp. Bot.* 58, 4047–4060. doi: 10.1093/jxb/erm261
- Rubio, S., Donoso, A., and Pérez, F. J. (2014). The dormancy-breaking stimuli "chilling, hypoxia and cyanamide exposure" up-regulate the expression of α-amylase genes in grapevine buds. *J. Plant Physiol.* 171, 373–381. doi: 10.1016/j.jplph.2013.11.009
- Rutschow, H. L., Baskin, T. L., and Kramer, E. M. (2011). Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. *Plant Physiol.* 155, 1817–1826. doi: 10.1104/pp.110.168.168187
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., et al. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19, 2370–2390. doi: 10.1105/tpc.107.05.2811
- Saito, T., Bai, S., Imai, T., Ito, A., Nakajima, L., and Moriguchi, T. (2015). Histone modification and signalling cascade of the dormancy-associated MADS-box gene, PpMADS13-1, in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) during endodormancy. *Plant Cell Environ.* 38, 1157–1166. doi: 10.1111/pce.12469
- Saito, T., Bai, S., Ito, A., Sakamoto, D., Saito, T., Ubi, B. E., et al. (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 Physiol.* 33, 654–667. doi: 10.1093/treephys/tpi037
- Sanchez-Perez, R., Del Cueto, J., Dicenta, F., and Martinez-Gomez, P. (2014). Recent advancements to study flowering time in almond and other *Prunus* species. *Front. Plant Sci.* 5:334. doi: 10.3389/fpls.2014.00334
- Sasaki, R., Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Kitamura, Y., Akagi, T., et al. (2011). Functional and expression analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiol.* 157, 485–497. doi: 10.1104/pp.111.181982
- Saure, M. C. (1985). "Dormancy release in deciduous fruit trees," in *Horticultural Reviews*, ed. J. Janick (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.), 239–300. doi: 10.1002/9781118060735.ch6
- Scalabrelli, G., Viti, R., and Cinelli, F. (1991). Change in the catalase activity and dormancy of apricot buds in response to chilling. *Acta Hort.* 293, 267–274. doi: 10.17660/ActaHortic.1991.293.31
- Seif El-Yazal, M. A., Seif El-Yazal, S. A., and Rady, M. M. (2014). Exogenous dormancy-breaking substances positively change endogenous phytohormones and amino acids during dormancy release in 'Anna' apple trees. *Plant Growth Regul.* 72, 211–220. doi: 10.1007/s10725-013-9852-1
- Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Meitha, K., Foyer, C. H., and Considine, M. J. (2018). Roles for light, energy, and oxygen in the fate of quiescent axillary buds. *Plant Physiol.* 176, 1171–1181. doi: 10.1104/pp.17.01479
- Siller-Cepeda, J. H., Fuchigami, L. H., and Chen, T. H. (1992). Glutathione content in peach buds in relation to development and release of rest. *Plant Cell Physiol.* 33, 867–872.
- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A., and Scorza, R. (2012). Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with poplar FT1 result in altered architecture,

- dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS One* 7:e40715. doi: 10.1371/journal.pone.0040715
- Stonebloom, S., Brunkard, A., Cheung, A. C., Jiang, K., and Zambryski, P. (2012). Redox states of plastids and mitochondria differentially regulate intercellular transport via plasmodesmata. *Plant Physiol.* 158, 190–199. doi: 10.1104/pp.111.186130
- Sudawan, B., Chang, C.-S., Chao, H. F., Ku, M. S. B., and Yen, Y. (2016). Hydrogen cyanamide breaks grapevine bud dormancy in the summer through transient activation of gene expression and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species. *BMC Plant Biol.* 16:202. doi: 10.1186/s12870-016-0889-y
- Tan, Y., Gao, D.-S., Li, L., Wei, H.-R., Wang, J.-W., and Liu, Q.-Z. (2015). Relationships between H₂O₂ metabolism and Ca²⁺ transport in dormancy-breaking process of nectarine floral buds. *Researchgate* 26, 425–429.
- Tarancon, C., Gonzalez-Grandio, E., Oliveros, J. C., Nicolas, M., and Cubas, P. (2017). A conserved carbon starvation response underlies bud dormancy in woody and Herbaceous Species. *Front. Plant Sci.* 8:788. doi: 10.3389/fpls.2017.00788
- Tilner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E. M. (2016). Staying tight: plasmodesmal membrane contact sites and the control of cell-to-cell connectivity in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 337–364. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015
- Tuan, P. A., Bai, S., Saito, T., Ito, A., and Moriguchi, T. (2017). Dormancy-Associated MADS-Box (DAM) and the abscisic acid pathway regulate pear endodormancy through a feedback mechanism. *Plant Cell Physiol.* 58, 1378–1390. doi: 10.1093/pcp/pcx074
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. doi: 10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x
- Ubi, B. E., Sakamoto, D., Ban, Y., Shimada, T., Ito, A., Nakajima, I., et al. (2010). Molecular cloning of dormancy-associated mads-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese pear. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 174–182.
- Uemura, M., and Steponkus, P. L. (1999). Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J. Plant Res.* 112, 245–254. doi: 10.1007/PL00013882
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., et al. (2009). Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2, 1310–1324. doi: 10.1093/mp/psp053
- van der Schoot, C., Paul, L. K., Paul, S. B., and Rinne, P. L. (2011). Plant lipid bodies and cell-cell signaling. *Plant Signal. Behav.* 6, 1732–1738. doi: 10.4161/psb.6.11.17639
- Vergara, R., Rubio, S., and Pérez, F. J. (2012). Hypoxia and hydrogen cyanamide induce bud-break and up-regulate hypoxic responsive genes (HRG) and VvFT in grapevine-buds. *Plant Mol. Biol.* 79, 171–178. doi: 10.1007/s11103-012-9904-3
- Viti, R., Bartolini, S., and Zanol, G. C. (2012). Biological changes and active oxygen-scavenging enzymes activities in apricot (*Prunus armeniaca* L.) flower buds during dormancy transitions. *Acta Hortic.* 940, 331–339. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.940.47
- Wang, D., Gao, Z., Du, P., Xiao, W., Tan, Q., Chen, X., et al. (2016). Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Crop Sci. Hortic.* 6:1248. doi: 10.3389/fpls.2015.01248
- Wang, M., van der Meulen, R. M., Visser, K., Van Schaik, H. P., Van Duijn, B., and de Boer, A. H. (1998). Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Sci. Res.* 8, 129–137. doi: 10.1017/S0960258500004025
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1988). Changes of fatty acids and sterols in apple buds during bud break induced by a plant bioregulator, thidiazuron. *Physiol. Plant.* 72, 115–120. doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb06631.x
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1990). Changes of membrane lipids in apple buds during dormancy and budbreak. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115, 803–808.
- Wang, S. Y., and Faust, M. (1994). Changes in polyamine content during dormancy in flower buds of 'Anna' Apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 70–73.
- Wang, S. Y., Ji, Z. L., Sun, T., and Faust, M. (1987). Effect of thidiazuron on abscisic acid content in apple bud relative to dormancy. *Physiol. Plant.* 71, 105–109. doi: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04625.x
- Wen, L. H., Zhong, W. J., Huo, X. M., Zhuang, W. B., Ni, Z. J., and Gao, Z. H. (2016). Expression analysis of ABA- and GA-related genes during four stages of bud dormancy in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 91, 362–369. doi: 10.1080/14620316.2016.1160546
- Wisniewski, M., and Ashworth, E. N. (1986). A comparison of seasonal ultrastructural changes in stem tissues of peach (*Prunus persica*) that exhibit contrasting mechanisms of cold hardiness. *Bot. Gaz.* 147, 407–417. doi: 10.1086/337608
- Wisniewski, M., Norelli, J., and Artlip, T. (2015). Overexpression of a peach CBF gene in apple: a model for understanding the integration of growth, dormancy, and cold hardiness in woody plants. *Front. Plant Sci.* 6:85. doi: 10.3389/fpls.2015.00085
- Wu, R., Wang, T., Warren, B. A. W., Allan, A. C., Macknight, R. C., and Varkonyi-Gasic, E. (2017). Kiwifruit SVP2 gene prevents premature budbreak during dormancy. *J. Exp. Bot.* 68, 1071–1082. doi: 10.1093/jxb/erx014
- Xu, H., Cao, D., Chen, Y., Wei, D., Wang, Y., Stevenson, R. A., et al. (2016). Gene expression and proteomic analysis of shoot apical meristem transition from dormancy to activation in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Sci. Rep.* 6:19938. doi: 10.1038/srep19938
- Yamane, H., Kashiwa, Y., Ooka, T., Tao, R., and 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. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133, 708–716.
- Yooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Chaum, S., et al. (2012). Hydrogen cyanamide enhances MRI-measured water status in flower buds of peach (*Prunus persica* L.) during winter. *Plant Omics* 5, 400–404.
- Yooyongwech, S., Horigane, A. K., Yoshida, M., Yamaguchi, M., Sekozawa, Y., Sugaya, S., et al. (2008). Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiol. Plant.* 134, 522–533. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01143.x
- Yooyongwech, S., Sugaya, S., Sekozawa, Y., and Gemma, H. (2009). Differential adaptation of high- and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content. *Plant Cell Rep.* 28, 1709–1715. doi: 10.1007/s00299-009-0770-7
- Zanol, G. C., Sekozawa, Y., Sugaya, S., and Gemma, H. (2010). The glutathione accumulation on mixed bud tissues during the dormancy of Japanese pear. *Acta Hortic.* 872, 77–84. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.872.7
- Zhang, Y., Sun, T., Liu, S., Dong, L., Liu, C., Song, W., et al. (2016). MYC cis-Elements in PsMPT promoter is involved in chilling response of *Paeonia suffruticosa*. *PLoS One* 11:e0155780. doi: 10.1371/journal.pone.0155780
- Zhang, Y. X., Yu, D., Tian, X. L., Liu, C. Y., Gai, S. P., and Zheng, G. S. (2015). Differential expression proteins associated with bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Biol.* 17, 114–122. doi: 10.1111/plb.12213
- Zheng, C., Halaly, T., Acheampong, A. K., Takebayashi, Y., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., et al. (2015). Abscissic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *J. Exp. Bot.* 66, 1527–1542. doi: 10.1093/jxb/eru519
- Zhong, W., Gao, Z., Zhuang, W., Shi, T., Zhang, Z., and Ni, Z. (2013). Genome-wide expression profiles of seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot. *Plant Mol. Biol.* 83, 247–264. doi: 10.1007/s11103-013-0086-4
- Zhuang, W., Gao, Z., Wang, L., Zhong, W., Ni, Z., and Zhang, Z. (2013). Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA4 in Japanese apricot flower bud dormancy release. *J. Exp. Bot.* 64, 4953–4966. doi: 10.1093/jxb/ert284
- Zhuang, W., Gao, Z., Wen, L., Huo, X., Cai, B., and Zhang, Z. (2015). Metabolic changes upon flower bud break in Japanese apricot are enhanced by exogenous GA4. *Hortic. Res.* 2:15046. doi: 10.1038/hortres.2015.46

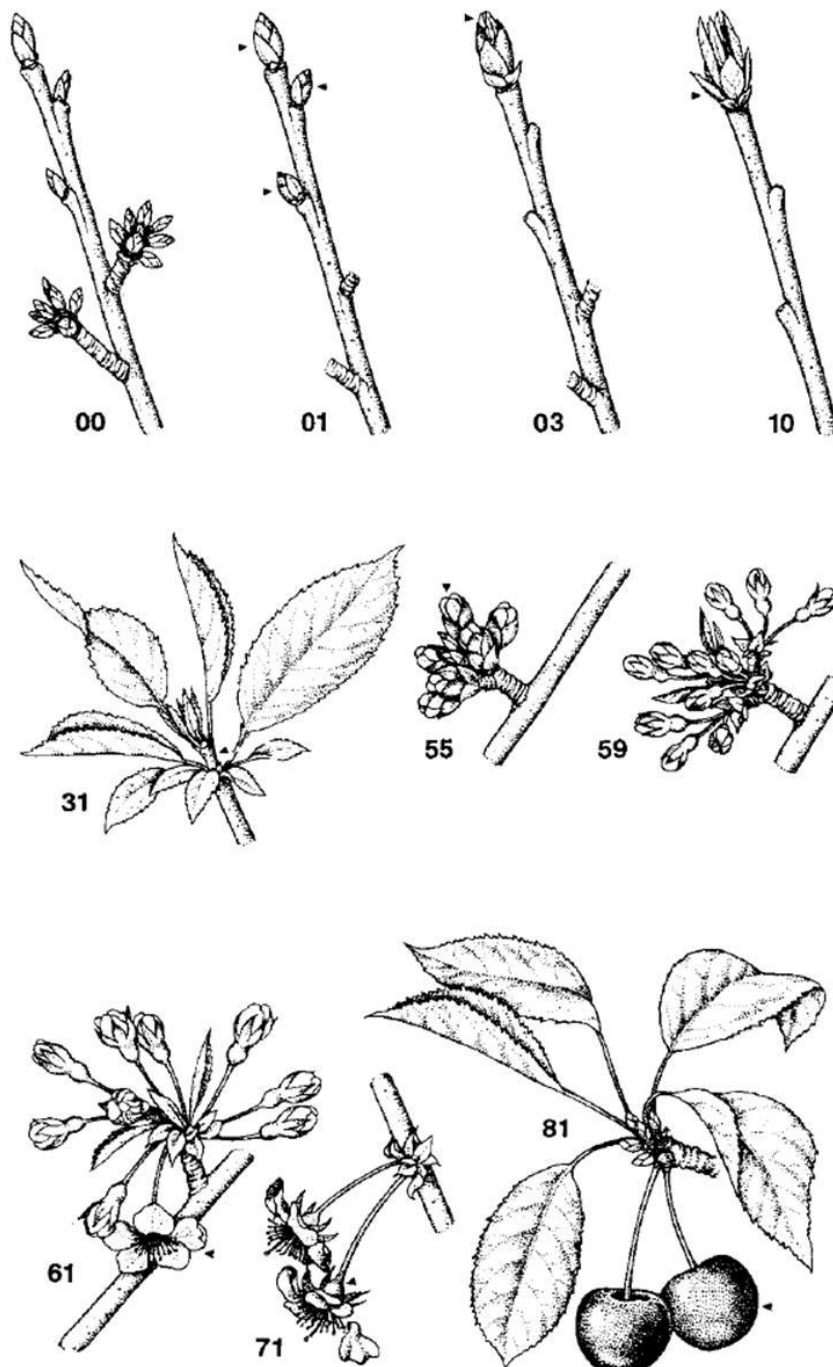
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Beauvieux, Wenden and Dirlwanger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2. Liste des variétés intégrées dans la core collection

N° de clone	Nom de la Variété	Pays d'origine*	Status	Type de Collection	Pedigree		Groupe de Diversité DAPC (Campoy <i>et al.</i> , 2016)	Date de Début de Floraison en Jour Julien Moyenne (2014-2015)	Date de Fin de Dorsaison en JJ Moyenne (2014-2015)
					Parent 1	Parent 2			
V0089	Bruelles	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	89	100
V0167	Guigne noire de Bocard	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	89	101
V0175	Kassins Frühe	DEU	Sélection ancienne	Collection INRA			1	97	106
V0305	Etienne Thuilleaux	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			9	88	103
V0370	Bigarreau Hatif Burlat	FRA	Sélection ancienne	Témoin de la Collection nationale			3	92	103
V0372	Précoce d'Isigny	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	89	98
V0785	Early Rivers	UK	Variété moderne	Collection INRA	Early Purple ^{pl}		9	92	102
V0896	Bigarreau Courte Queue	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	88	99
V0897	Cristobalina	ESP	Variété traditionnelle	Collection INRA			7	70	87
V1316	Mora di Cazzano	ITA	Variété traditionnelle	Collection INRA			5	94	106
V1406	Grosse Schwarzkornpel	DEU	Variété moderne	Collection INRA			6	90	101
V1518	Merton Crane	UK	Variété moderne	Collection INRA			6	97	109
V1607	Noire de Meched	IRN	Variété traditionnelle	Témoin de la Collection nationale			2	97	108
V1877	Géant d'Hedelfingen	DEU	Sélection ancienne	Collection INRA			7	99	110
V1903	Van	CAN	Variété moderne	Collection INRA	Impératrice Eugénie pl		4	92	104
V1906	Szwecja A.	POL	Variété moderne	Collection INRA			9	90	102
V1927	Stark Hardy Giant	USA	Variété moderne	Collection INRA			4	92	104
V1931	Rainier	USA	Variété moderne	Témoin de la Collection nationale	Bing	Van	4	92	104
V2007	Turca	ITA	Variété traditionnelle	Collection INRA			5	97	106
V2033	Bigarreau Camus de Venasque	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			3	97	105
V2066	Vista	CAN	Variété moderne	Collection INRA	Hedelfinger	Victor	4	92	103
V2080	Stella	USA	Variété moderne	Collection INRA	Lambert	John Innes 2420	6	95	106
V2155	Garnet®	USA	Variété moderne	Collection INRA			4	89	99
V2180	Lapins	CAN	Variété moderne	Collection INRA	Van	Stella	4	91	101
V2229	Noire Vatilleu	FRA	Variété traditionnelle	Collection INRA			8	97	108
V2472	Duroni 3	ITA	Variété traditionnelle	Collection INRA			3	97	109
V2680	Ferzer (Arcina®)	FRA	Variété moderne	Collection INRA	Stark Hardy Giant pl		4	91	104
V2868	Regina	DEU	Variété moderne	Collection INRA	Heiders Späte Knorpelkirs	Rube	2	96	108
V2903	Graffioni	ITA	Variété moderne	Collection INRA			5	99	110
V2965	Schmidt	DEU	Variété moderne	Collection INRA			1	93	104
V2977	Margit	HUN	Variété moderne	Collection INRA	Gemersdorfer	Bekescsaba	2	94	105
V2891	Valerij Chkalov	UKR	Variété moderne	Collection INRA			8	88	102
V3076	Yuko Nishiki	JAP	Variété traditionnelle	Collection INRA			6	90	103
V3082	Nanyo	JAP	Variété traditionnelle	Collection INRA			6	100	111
V3094	Ferprime (Primulat®)	FRA	Variété moderne	Collection INRA	Ferzer pl		4	91	101
V3115	Ferdiva	FRA	Variété moderne	Collection INRA	Ferzer pl		4	99	108
V3142	Rippert Botond	HUN	Variété moderne	Collection INRA			6	100	110
V3855	V3855	FRA	Variété traditionnelle	Collection INRA			8	84	98
V3856	Saint Georges	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	69	84
V4081	Blancale precoce	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	89	104
V4089	Bigarreau de Juin	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	97	108
V4096	Le cardan	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	100	113
V4098	Abouriou	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			9	88	100
V4100	Bigarreau Cœur de Pigeon tardif	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	99	111
V4102	Xapata	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	92	102
V4104	Blancale tardive	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	96	106
V4119	Gascogne tardive de Seninghem	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	96	109
V4123	Cacouanne blanche	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			1	100	111
V4127	Franç Tellier	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	88	100
V4133	Gascogne double	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	97	109
V4137	Versaillaise	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			5	98	111
V4249	Jerusalem	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			8	99	113
V4252	Durette	FRA	Variété traditionnelle	Collection nationale			7	98	106
V4285	Vic	CAN	Variété moderne	Collection INRA	Bing	Schmidt	6	98	108
Abbreviations									
pl: Pollinisation libre									
JJ= Jour Julien									
* Codes pays selon ISO 3166-1 alpha-3									

Stone fruit



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.)

Code	Description
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 developing 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

¹ From terminal bud

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
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

Annexe 4. Mode Opératoire « Dosage des Hormones »

Plateforme Metatoul

1 Protocole

1.1 Mise au point

Le protocole a été décrit par (Götz et al., 2014)) et modifié par S. Danoun et S. Fournier en 2015 (communication personnelle),

Les mises au point ont été effectuées sur un échantillon provenant d'un mélange de poudre des pools.

Environ 40 mg de poudre ont été utilisés dans 3 tubes pour 2 protocoles soit 240 mg en tout.

Ils ont été disposés comme suit :

Tube	Echantillon	Interne Standard ¹	H avant extraction	H après extraction
A1	oui	oui	non	non
A2	oui	oui	oui	non
A3	oui	oui	non	oui
A4	non	oui	non	oui

La même procédure est utilisée pour les deux extractions. L'intérêt est d'estimer :

Le rendement de l'extraction (rapport quantité d'hormones connue avant/après l'extraction)

L'effet de la matrice (rapport quantité d'hormones dans la référence non extraite/quantité hormones dans l'échantillon après dopage).

1.2 Extraction

Protocole A

- ajouter 500µL de solution MeOH 60%
- ajouter 5 µL de solution SI
- sonication pendant 3 minutes
- incubation à 4°C sous agitation pendant la nuit (19h)
- centrifugation 10000g pendant 10 minutes à 4°C
- récupération 300µL de surnageant et évaporation sous azote²
- reprise dans 200µL eau/ACN 50/50 et acide formique 0.05

Protocole B

- ajouter 500µL de solution tampon
- ajouter 5 µL de solution SI
- sonication pendant 3minutes
- incubation à 4°C sous agitation pendant 4h30
- centrifugation 10000g pendant 10 minutes à 4°C
- prélever 200µL de surnageant pour analyses LC-MS

Protocole B marche mieux, plus rapide (pas de séchage) => utilisé pour les échantillons. Les échantillons contenaient entre 110 et 150 mg de matière fraîche congelée.

Après extraction (pour le protocole B) prélever simplement 200µl de la solution à mettre dans un vial pour analyse LC-MS

¹ Quantité connue de la molécule à doser, ajoutée aux échantillons

² Objectif : reconcentrer les échantillons

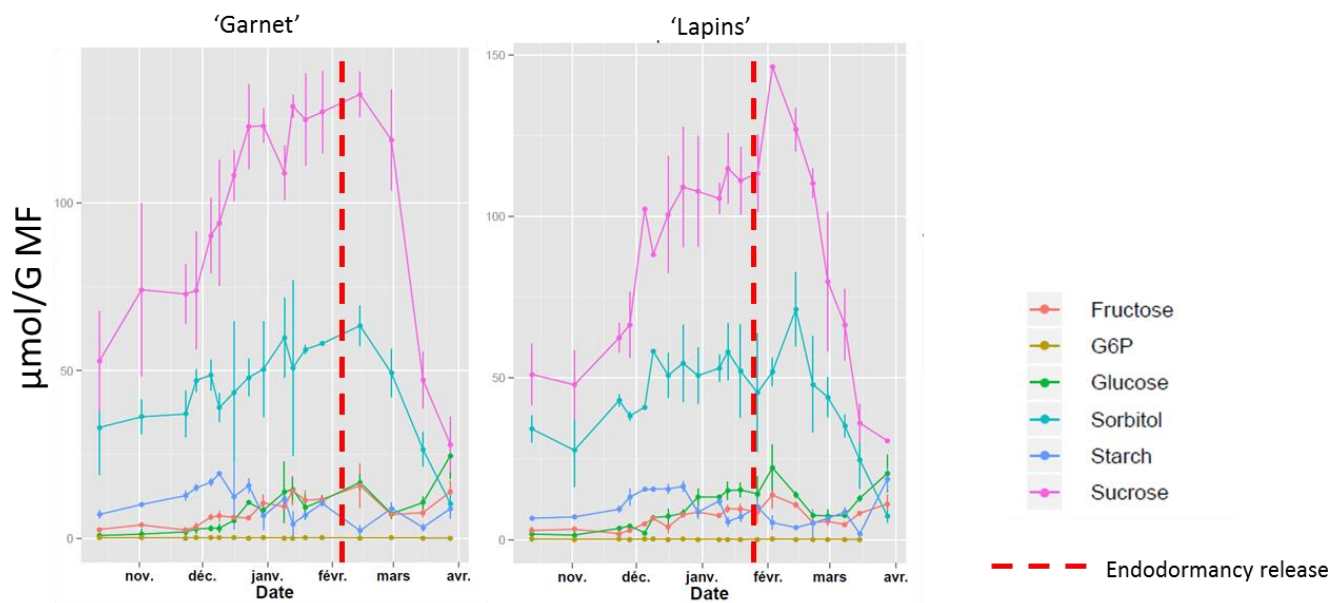
Annexe 5. Liste des gènes répertoriés au cours de cette étude

Voie	Nom	Prunus persica transcript	TAIR match	Figure	cluster / Groupe
Gibbérélines	GA20ox2	Prupe.2G286800	AT5G51810	Figure 30	GA20ox
	GA2ox1	Prupe.4G150200	AT1G78440	Figure 30	GA2ox
	GA2ox2	Prupe.4G080700	AT1G30040	Figure 30	GA2ox
	GA2ox8-1	Prupe.4G026300	AT4G21200	Figure 30	GA2ox
	GA2ox8-2	Prupe.4G204600	AT4G21200	Figure 30	GA2ox
	GA3ox1	Prupe.1G467600	AT1G15550	Figure 30	GA3ox
	GA-reg-1	Prupe.1G426700	AT5G59845	Figure 30	response
	GA-reg-2	Prupe.3G161500	AT1G74670	Figure 30	response
	GA-reg-3	Prupe.3G267600	AT5G15230	Figure 30	response
	GA-reg-4	Prupe.4G257500	AT1G74670	Figure 30	response
	GA-reg-5	Prupe.5G193400	AT1G74670	Figure 30	response
	GD1B	Prupe.8G249800	AT3G63010	Figure 30	receptor
	GD1C	Prupe.6G332800	AT5G27320	Figure 30	receptor
	RGA2	Prupe.7G236100	AT1G14920	Figure 30	DELLA
	RGA	Prupe.1G329600	AT2G01570	Figure 30	DELLA
ABA	RGL2	Prupe.3G162500	AT3G03450	Figure 30	DELLA
	ABF2	Prupe.1G434500	AT1G45249	Figure 33	response
	ABF3	Prupe.8G126600	AT4G34000	Figure 33	response
	CYP707A2	Prupe.6G072400	AT2G29090	Figure 33	degradation
	CYP707A4	Prupe.8G125800	AT3G19270	Figure 33	degradation
	NCED3	Prupe.4G150100	AT3G14440	Figure 33	synthesis
	NCED4	Prupe.1G255500	AT4G19170	Figure 33	synthesis
	NCED5	Prupe.4G082000	AT1G30100	Figure 33	synthesis
PPP	PYL8	Prupe.2G308200	AT5G53160	Figure 33	receptor
	G6PD	Prupe.3G300200	AT5G40760	Figure 37	G6PD
Glutathion	GPX	Prupe.1G186500	AT2G31570	Figure 37	GPX - group1
		Prupe.1G395200	AT2G25080	Figure 37	GPX - group2
		Prupe.5G098400	AT4G11600	Figure 37	GPX - group2
		Prupe.5G098500	AT4G11600	Figure 37	GPX - group1
		Prupe.5G098600	AT4G11600	Figure 37	GPX - group1
	GST	Prupe.8G244300	AT2G48150	Figure 37	GPX - group1
		Prupe.1G264700	AT1G10370	Figure 37	GST
		Prupe.3G178200	AT2G30860	Figure 37	GST
	GR	Prupe.1G004800	AT3G24170	Figure 37	GR
		Prupe.8G231700	AT3G54660	Figure 37	GR
Catalase	CAT	Prupe.5G011300	AT4G35090	Figure 38	CAT
		Prupe.5G011400	AT4G35090	Figure 38	CAT
SOD	SOD	Prupe.1G347200	AT5G23310	Figure 38	SOD - group1
		Prupe.2G262400	AT3G10920	Figure 38	SOD - group1
		Prupe.2G269400	AT5G51100	Figure 38	SOD - group1
		Prupe.6G042300	AT3G10920	Figure 38	SOD - group2
		Prupe.6G112800	AT2G28190	Figure 38	SOD - group2
		Prupe.7G005300	AT5G18100	Figure 38	SOD - group2
Respiration mitochondriale	ATP synthesis.alternative oxidase	Prupe.1G061800	AT5G64210	Figures 40-41	royal blue
	ATP synthesis.cytochrome c oxidase	Prupe.1G098600	AT5G57815	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G214800	AT1G28140	Figures 40-41	red
		Prupe.1G473400	AT1G80230	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G583400	AT1G57600	Figures 40-41	purple
		Prupe.3G078600	AT3G15640	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.5G234900	AT3G17910	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.6G213100	AT4G37830	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.6G279900	AT3G08950	Figures 40-41	royal blue
	ATP synthesis.cytochrome c reductase	Prupe.8G266700	AT5G61310	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G214500	AT5G13430	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G250900	AT5G05370	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G472700	AT5G25450	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G506800	AT3G52730	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.6G038800	AT3G10860	Figures 40-41	purple
		Prupe.7G110400	AT3G52730	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.8G028000	AT1G15120	Figures 40-41	royal blue
	ATP synthesis.electron transfer flavoprotein	Prupe.1G037500	AT5G43430	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G197500	AT2G43400	Figures 40-41	red
		Prupe.4G205700	AT1G50940	Figures 40-41	royal blue
	ATP synthesis.NADH-DH	Prupe.1G231900	AT5G08530	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G340400	AT2G02050	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.1G421800	AT5G67590	Figures 40-41	purple
		Prupe.5G221100	AT3G18410	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.6G219700	AT5G67590	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.8G214700	AT2G20360	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.8G260800	AT2G47690	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.3G231400	AT4G28220	Figures 40-41	red
	ATP synthesis.NADH-DH.type II	Prupe.4G037100	AT4G21490	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.4G039000	AT1G07180	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.5G076700	AT5G08740	Figures 40-41	royal blue
		Prupe.6G055600	AT2G29990	Figures 40-41	red

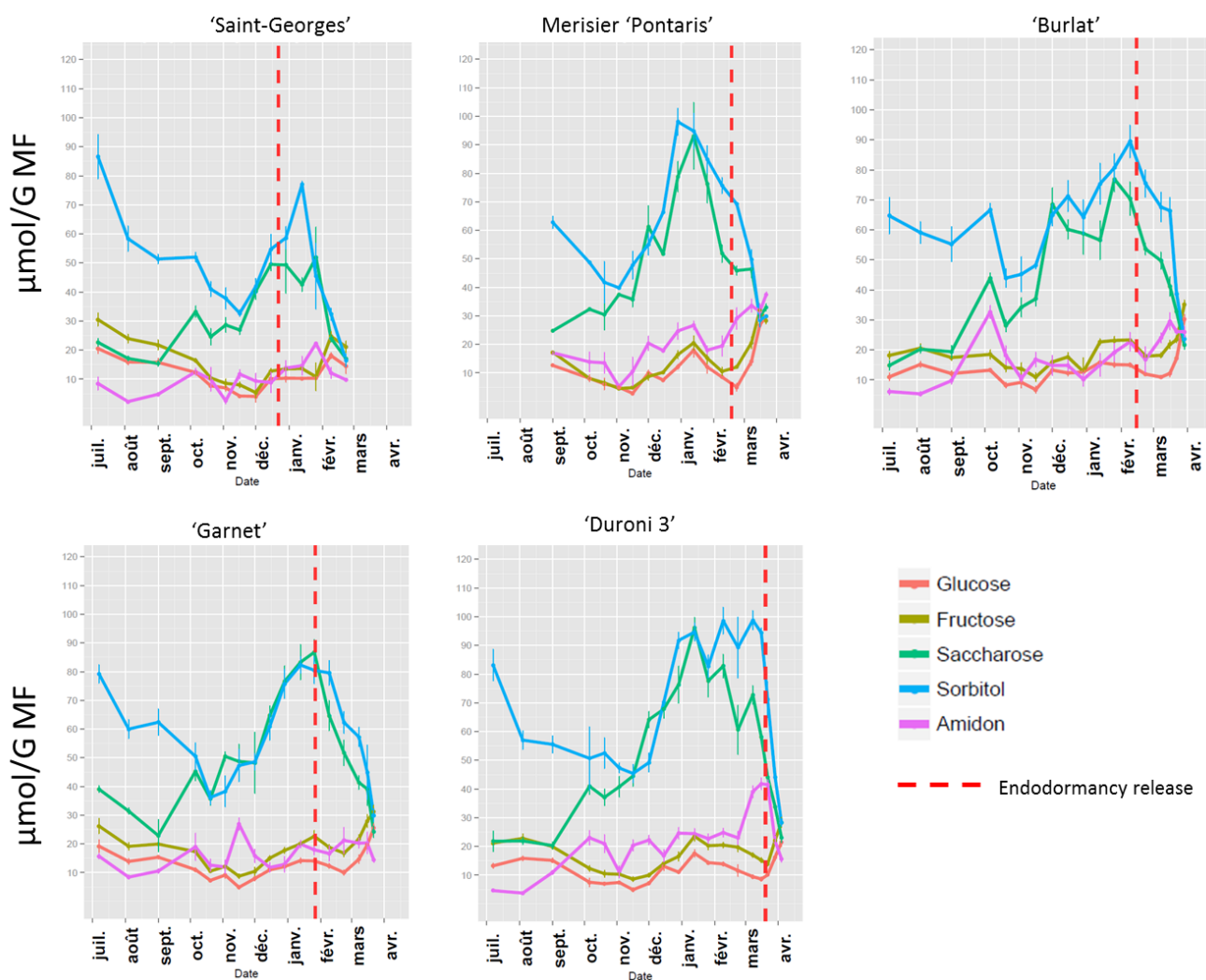
Liste des gènes répertoriés classés par voie, nom, numéro d'accèsion de *P.Persica* V2.0, meilleur hit *Arabidopsis*, figure sur laquelle est présente le gène et la couleur de représentation.

Annexe 6. Dosages de sucres pour les variétés supplémentaires des années 2010-2011 et 2015-2016

Dosages 2010-2011



Dosages 2015-2016



Etude de la dormance des bourgeons chez cerisier doux (*Prunus avium*)

Chez les espèces fruitières, la dormance est une période clé qui influencera la floraison et la fructification. La dormance est finement régulée par de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Elle est composée de deux phases principales, l'endodormance (ou dormance « vraie ») et l'écodormance (ou dormance « environnementale »). L'endodormance est caractérisée par une incapacité totale des bourgeons à débourrer, même dans des conditions normalement propices à la croissance. C'est le froid hivernal qui permet la sortie de l'endodormance, nécessaire à la floraison puis la fructification. Les besoins en froid, quantité nécessaire de froid pour accéder à la levée de l'endodormance, sont génétiquement déterminés, et sont relativement élevés chez la plupart des variétés de cerisier doux (*Prunus avium* L.) comparativement à d'autres espèces. Dans un contexte de réchauffement climatique, les besoins en froid pourraient ne plus être satisfaits et conduire à des pertes économiques. L'objectif de cette thèse est donc d'approfondir les connaissances sur les voies impliquées dans la levée d'endodormance. L'étude porte sur un panel de variétés contrastées pour leurs besoins en froid, depuis des variétés très précoces comme 'Cristobalina' jusqu'à des variétés très tardives comme 'Fertard'. Des approches métabolomiques, moléculaires et d'apport exogène de molécules ont été utilisées. Les résultats montrent que les voies 1) hormonales, 2) du stress oxydatif et 3) des sucres, ont un rôle différent. La voie des sucres donne un aperçu de l'activité métabolique ainsi que des marqueurs des différentes phases de la dormance. La voie hormonale est un système permettant de contrôler la croissance sans lien causal sur la dormance. La voie du stress oxydatif indique que les variétés précoces sont dans un état globalement plus oxydé que les variétés tardives lors de cette période. Les données de RNA-seq permettent l'identification de gènes ayant un rôle majeur dans la dormance et de confirmer les hypothèses des mécanismes impliqués. Ces résultats seront déterminants pour la création de variétés adaptées aux conditions climatiques futures.

Mots clés : Dormance, métabolisme, expression de gènes, changements climatiques, *Prunus avium* L.

Bud dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.)

Among fruit tree species, dormancy is a key period determining the success of flowering and fruit producing. Dormancy is tightly regulated by numerous genetic and environmental factors. It can be divided in two main phases: endodormancy ("true dormancy") and ecodormancy ("environmental dormancy"). Endodormancy is characterized by a total incapacity of buds to burst, even in conditions proper to growth. Winter chilling enables the end of endodormancy, necessary for flowering and fruit production. Chilling requirements, necessary amount of chill for endodormancy release, are genetically fixed and relatively elevated in sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties compared to other species. In a climate change context, chilling requirements may not be entirely fulfilled and lead to drastic economic losses. The objective of this work is to increase the knowledge on the pathways involved in endodormancy release. The study relies on a panel of varieties contrasted for their chilling requirements, varying from a very low chill cultivar 'Cristobalina' to a high chill cultivar 'Fertard'. Metabolomics and molecular studies, and exogenous molecules supply were used for dormancy deciphering. Hormonal pathway, oxidative stress and sugar pathway seem to have different roles. Sugar pathway enables to have an overview of the metabolic activity, and may be used as molecular markers to identify dormancy phases. Hormonal pathway has a role on growth control but no causal link with dormancy release was assessed. Major results concern the role of oxidative stress, with low chill cultivars in a more oxidized status than high chill cultivars. Moreover, RNAseq data enable the identification of key genes controlling dormancy and confirms the hypothesis on mechanisms involved. These results will be crucial for breeding new varieties well adapted to future climatic conditions.

Keywords: Dormancy, metabolomics, gene expression, climatic change, *Prunus avium* L.
