



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر
ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE – EL HARRACH- ALGER

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat d'Etat en Sciences Agronomiques

Département : Productions végétales

Spécialité : Production et amélioration végétales

Déterminisme génétique des caractères de
"fitness" en condition de stress hydrique chez
Medicago truncatula

Présenté par : *KADRI Adel*

Soutenu le : 27 / 06 / 2018

Devant le jury :

Président :	M. OUNANE SIDI Mohamed	(Pr. ENSA)
Directeur de thèse :	Mme LAOUAR Meriem	(MCA. ENSA)
Co-directeur de thèse :	M. ABDELGUERFI Aissa	(Pr. ENSA)
Examineurs :		
	M. DJEBBAR Réda	(Pr. USTHB)
	M. M'HAMMEDI BOUZINA Mahfoud	(Pr. Univ. Chlef)
	Mme YKHLEF Nadia	(Pr. Univ. Constantine)

Summary:

Drought is one of the most important abiotic stresses affecting both natural and cultivated plants. But although in cultivated plants it is closely related to productivity and yield components, in natural species it mainly affects the fitness traits that ensure the survival and durability of the species.

This work aims to exploit the natural genetic variability that exists in the species *Medicago truncatula* in order to identify the genetic determinants (QTL) of some fitness traits in response to cyclic and progressive end-of-cycle water stress. Indeed, this species has a great natural diversity and genetic tools and is often used to cope with periods of drought in its natural environment.

In a first experiment, ten lines (A10, Jemalong-A17, DZA315.16, F83005.5, F83005.9, TN1.11, TN1.21, TN6.18, and TN8.3) derived from natural populations and whose genetic maps are available, have been used to explore the genetic variability relative to fitness traits. Three successive cycles of water stress have been applied during the reproductive period, which is considered the most drought sensitive for this species. The results obtained revealed a great genetic variability between the studied lines, whatever the water regime applied. The comparison between the averages obtained under stressed conditions and those of the unstressed condition showed a considerable decrease (5-74%) for most of the studied traits, in particular for the total weight of the pods, the total number of pods and the total number of seeds per pod. Among contrasting lines in response to water stress, there is TN1.11 and A17.

In a second experiment, we used the RIL LR7 population (population of recombinant lines), resulting from the cross between the two lines: TN1.11 x A17, to start a QTL analysis. The analysis was done on vegetative traits noted before the application of water stress (before flowering) as well as on fitness characters (unstressed condition and under water deficit).

A total of 49 QTLs, accounting for between 6 and 38% of the phenotypic variation were detected. All chromosomes are involved with the exception of chromosome 6. The highest number is on chromosome 7 (16 QTL) which is a collection of QTL representing traits noted under different conditions and co-located together. The highest LOD score (21.7) was found for the flowering date (chromosome 7) with a phenotypic variance of 38%.

In this study, no major QTL specific to a water condition was detected. However, the results obtained showed that QTL for fitness traits were numerous with small additive effects suggesting that the response to drought is governed by several genes with weak effects. This implies that several QTL must be handled at the same time by breeders, to obtain a significant impact.

Key words: *Medicago truncatula*, RIL, QTL, fitness, drought.

Résumé :

La sécheresse est l'un des stress abiotiques les plus importants qui touche autant les plantes naturelles que celles cultivées. Mais bien que chez ces dernières, il est étroitement lié à la productivité et aux caractères de rendement, chez les espèces naturelles, il affecte surtout les caractères de fitness qui assurent la survie et la pérennité de l'espèce.

Ce travail se propose d'exploiter la variabilité génétique naturelle qui existe chez l'espèce *Medicago truncatula* afin d'identifier les déterminants génétiques (QTL) de quelques caractères de fitness en réponse à un stress hydrique cyclique et progressif de fin de cycle. En effet, cette espèce dispose d'une grande diversité naturelle et d'outils génétiques et a souvent l'habitude de faire face à des périodes de sécheresse dans son milieu naturel.

Dans une première expérimentation, dix lignées (A10, Jemalong-A17, DZA315.16, F83005.5, F83005.9, TN1.11, TN1.21, TN6.18, et TN8.3) dérivées de populations naturelles et ayant fait l'objet d'une cartographie génétique ont été utilisées pour explorer la variabilité génétique relative à quelques caractères de fitness. Trois cycles successifs de stress hydrique ont été appliqués en période reproductive. Cette dernière est considérée comme la plus sensible à la sécheresse pour cette espèce. Les résultats obtenus ont révélé une très grande variabilité génétique entre les lignées étudiées, quel que soit le régime hydrique appliqué. La comparaison, entre les moyennes obtenues en condition stressée avec celles de la condition non stressée, a mis en évidence une diminution considérable (5-74%) pour la plupart des caractères étudiés, notamment pour le poids total des gousses, le nombre total de gousses et le nombre total de graines par gousse. Parmi les lignées contrastantes en réponse au stress hydrique il y a la lignée TN1.11 et A17.

Dans une deuxième expérimentation, nous avons utilisé la population RIL LR7 (Population de lignées recombinantes), issue du croisement entre les deux lignées TN1.11 x A17, pour entamer une analyse QTL. L'analyse a été faite sur des caractères végétatifs notés avant l'application du stress hydrique (avant floraison) ainsi que sur des caractères de fitness (condition non stressante et sous déficit hydrique).

Un total de 49 QTL, expliquant entre 6 et 38% de la variation phénotypique ont été détectés. Tous les chromosomes sont impliqués à l'exception du chromosome 6. Le nombre le plus élevé se trouve sur le chromosome 7 (16 QTL) qui rassemble des QTL représentant des caractères notés dans différentes conditions et qui co-localisent ensemble. Le LOD score le plus élevé (21.7) a été trouvé pour la date de floraison (chromosome 7) avec une variance phénotypique de 38%.

Dans cette étude, aucun QTL majeur spécifique à une condition hydrique n'a été détecté. Cependant, les résultats obtenus ont montré que les QTL relatifs aux caractères de fitness étaient nombreux avec de petits effets additifs suggérant que la réponse à la sécheresse est régie par plusieurs gènes avec des effets faibles. Ceci implique que plusieurs QTL doivent être manipulés en même temps par le sélectionneur, pour obtenir un impact significatif.

Mots clés : *Medicago truncatula*, RIL, QTL, fitness, sécheresse.

ملخص:

يعتبر الجفاف من أهم المخاطر التي تؤثر على النباتات الطبيعية فضلا عن المزرعة. هاته الأخيرة يؤثر فيها من جهة ارتباطها الوثيق بالإنتاجية وعوامل المردود، في حين أنه يؤثر عند النباتات الطبيعية على صفات اللياقة التي تضمن بقاء الأنواع واستمراريتها.

يهدف هذا العمل إلى استغلال التباين الوراثي الطبيعي الموجود عند النوع *Medicago truncatula* من أجل تحديد المواقع الوراثية (QTL) لبعض صفات اللياقة تحت تأثير إجهاد مائي دوري وتدرجي. علما ان هذا النوع له تنوع طبيعي كبير وأدوات جينية وغالباً ما يواجه فترات الجفاف في بيئته الطبيعية.

في التجربة الأولى تم استخدام عشرة سلالات نقية (A10، Jemalong-A17، DZA315.16، F83005.5، F83005.9، TN1.11، TN1.21، TN6.18، TN8.3) مستخرجة من مجموعات طبيعية من أجل استكشاف التنوع الوراثي المرتبط ببعض صفات اللياقة. تم تطبيق ثلاث دورات متتالية من الإجهاد المائي خلال فترة التكاثر. النتائج المتحصل عليها كشفت عن تنوع جيني كبير بين السلالات المدروسة بغض النظر عن نظام المياه المطبق. أظهرت المقارنة بين النتائج التي تم الحصول عليها تحت الإجهاد المائي وتلك في الحالة العادية انخفاضا كبيرا (5-74٪) لمعظم الصفات التي تم دراستها، لا سيما بالنسبة للوزن الكلي للقرن، العدد الإجمالي للقرن والعدد الإجمالي للبذور في القرن.

في تجربة ثانية، استخدمنا مجموعة RIL LR7 الناتجة عن التقاطع بين TN1.11 x A17 لبدء تحليل QTL، تم إجراء التحليل على الخصائص النباتية التي لوحظت قبل تطبيق الإجهاد المائي (قبل الإزهار) وكذلك على خصائص اللياقة (تحت الإجهاد المائي و دون اجهاد).

تم الكشف عن ما مجموعه 49 QTL وهو ما يمثل ما بين 6 و 38 ٪ من الاختلاف المظهري، جميع الكروموسومات معينة باستثناء الكروموسوم 6. أكبر رقم تم تسجيله على الكروموسوم 7 (16 QTL). نتيجة اللتي الاكبر LOD وجدت (21.7) سجلت عند تاريخ الأزهار (الكروموسوم 7).

في هذه الدراسة، لم يتم اكتشاف أي QTL رئيسي خاص بالجفاف. ومع ذلك، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن QTL صفات اللياقة كانت عديدة مع تأثيرات مضافة صغيرة تشير إلى أن الاستجابة للجفاف تحكمها عدة جينات ذات تأثيرات ضعيفة.

هذا يحتم على الناخب التعامل مع العديد من QTL للحصول نتائج إيجابية.

الكلمات المفتاحية الجفاف، صفات اللياقة، QTL، RIL، *Medicago truncatula*

Dédicace

Cette thèse représente l'aboutissement d'un long périple, sans le soutien et les encouragements de ma femme, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je dédie ce travail à mes parents, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours épaulé par leurs prières et leurs encouragements.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui ma donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon directeur de thèse Mme Laouar Meriem pour le suivi attentif tout au long des différentes étapes d'élaboration de cette thèse, pour ces lectures attentives de mon manuscrit, et pour son sens critique.

J'aimerais aussi remercier, mon co-directeur de thèse M. Abdelguerfi Aïssa pour m'avoir d'une part offert l'opportunité de réaliser ce travail dans le cadre d'un projet de recherche algéro-français, dans lequel je me suis épanoui scientifiquement, et d'autre part pour m'avoir fait confiance à mener ce travail a bon port.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Mme Bernadette Julier-Koubaiti, qui ma reçu dans son laboratoire à Lusignan. Son expertise dans le domaine de la génétique quantitative, sa rigueur scientifique ainsi que sa grande disponibilité tout au long de cette thèse et particulièrement lors de la rédaction de mon article, ont grandement contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie aussi M. Mounawer Badri, M. Laurent Gentzbittel, Mme Cécile Ben, et M. Brahim Mouhouche pour avoir participé à la concrétisation de ce travail.

Je remercie les membres du comité de thèse : Mme Ykhlef Nadia, MM. M'hammedi Bouzina Mahfoud et Djebbar Reda, pour leurs conseils avertis et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

J'adresse un remerciement particulier à M. Ounane Sidi Mohamed pour avoir accepté de présider le jury.

Mes remerciements vont aussi sincèrement à mes amis, Torchit Nadir, Oulkiar Redha ,Amokrane Mohammed Yanis et Walid qui ont toujours été là pour m'épauler et m'encourager.

Je remercie tous ceux qui ont de près ou de loin contribués à l'aboutissement de ce travail.

Liste des abréviations et acronymes

Sigles des organismes

AMGRC:	Australian Medicago Genetic Resource Center
ARS- USDA :	Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture
CBBC :	Center of biotechnology of BorjCedria
CNRS :	Centre national de la recherche scientifique
ENSAT :	Ecole nationale supérieure d'agronomie de Toulouse
GBBV :	Laboratoire de génétique, biochimie et biotechnologie végétale
ICARDA :	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique
LILM:	Laboratoire Interactions légumineuses Microorganismes (CBBC)
SARDI :	South Australian Research and Development Institute

Abréviations générales

AB-QTL :	Advanced back-cross QTL analysis
AND:	Acide désoxyribonucléique
CIM:	Composite Interval Mapping
GS :	Génomique Sélection
GWAS:	Genome-wide association study
LOD:	Logarithm of the odd score
LG :	Linkage groupe
LR :	lignée recombinante
QTL :	Quantitative trait locus
QTN :	Quantitative trait Nuclotide
RIL :	Recombinant Inbred Line
ROS:	Reactive Oxygen Species
SIM:	Simple Interval Mapping
SNP :	Single nucléotide polymorphisms
SSR :	Single sequence repeat / marqueur microsatellite

Liste des figures

	Page
Fig. 1 : Relation phylogénique entre espèces de légumineuses.....	05
Fig. 2 : Taxonomie du genre <i>Medicago</i>	07
Fig. 3 : Morphologie de <i>M. truncatula</i>	10
Fig. 4 : Diagramme schématique de <i>Medicago truncatula</i>	11
Fig. 5 : Lignées recombinantes.....	17
Fig. 6 : Exemple de courbe de LOD.....	20
Fig. 7 : Ensemble des différentes populations de cartographie.....	39
Fig. 8 : Effet du traitement hydrique sur la longueur du rameau par lignée.....	41
Fig. 9 : Effet du traitement hydrique sur le nombre d'entre nœuds par lignée.....	42
Fig. 10 : Diversité de la date de floraison pour les 10 lignées de <i>M. truncatula</i>	43
Fig. 11 : Effet du traitement hydrique sur le nombre de graines par gousse par lignée.....	44
Fig. 12 : Effet du traitement hydrique sur le nombre total de gousses par lignée.....	45
Fig. 13 : Effet du traitement hydrique sur le poids total des gousses par lignée.....	45
Fig. 14 : Effet du traitement hydrique sur le nombre total de graines par lignée.....	46
Fig. 15 : Effet du traitement hydrique sur le poids moyen des gousses par lignée.....	47
Fig. 16 : Effet du traitement hydrique sur le nombre de gousses sur les deux tiges principales par lignée.....	48
Fig. 17 : Matrice des corrélations pour les différents paramètres en condition contrôle.....	49
Fig. 18 : Matrice des corrélations pour les différents paramètres en condition de stress hydrique.....	49
Fig. 19 : Graphe des individus montrant la répartition des lignées en condition contrôle.....	51
Fig. 20 : Cercle des corrélations entre les différents paramètres en condition contrôlée.....	51
Fig. 21 : Graphe des individus montrant la répartition des lignées en condition de stress hydrique.....	51
Fig. 22 : Cercle des corrélations entre les différents paramètres en condition de stress hydrique.....	51
Fig. 23 : Classification ascendante hiérarchique (méthode de Ward) des 10 lignées de <i>M. truncatula</i> basée sur les distances euclidiennes.....	52
Fig. 24 : Différentes étapes de culture de <i>M. truncatula</i>	59
Fig. 25 : Calcul des fractions de recombinaison.....	62
Fig. 26 : Visualisation de la répartition des marqueurs sur la carte génétique.....	62
Fig. 27 : Représentation graphique des génotypes manquants dans la carte génétique.....	63
Fig. 28 : Matrice des corrélations pour les différents caractères avant stress en 2013.....	70
Fig. 29 : Matrice des corrélations pour les différents caractères avant stress en 2014.....	70

Fig. 30 :	Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en irrigué 2013.....	71
Fig. 31 :	Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en stressé 2013.....	72
Fig. 32 :	Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en irrigué 2014.....	72
Fig. 33 :	Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en stressé 2014.....	73
Fig. 34 :	LOD score pour la date de floraison sur les différents chromosomes dans les deux années d'expérimentations.....	75
Fig. 35 :	QTL de la date de floraison sur le chromosome 7 dans les deux années d'expérimentations (2013-2014).....	75
Fig. 36 :	LOD score pour le nombre de graines par gousse en condition irriguée (2014).....	76
Fig. 37 :	LOD Score pour le nombre total de gousses par plante en stressé et en irrigué (2013).....	77
Fig. 38 :	LOD score pour le poids total des gousses par plante en condition stressée (2013).....	77
Fig. 39 :	LOD Score pour le poids total des gousses par plante en condition stressée sur le chromosome 8 (2013).....	78
Fig. 40 :	LOD Score pour le poids total des graines par gousse en condition irriguée (2014) sur le chromosome 4.....	79
Fig. 41:	LOD Score pour le poids moyen des gousses en condition irriguée (2014) sur le chromosome 2.....	80
Fig. 42 :	LOD Score pour le poids moyen des graines par gousse en condition irriguée (2014).....	81
Fig. 43 :	LOD Score pour la longueur du rameau principal en condition stressée (2014) sur le chromosome 2.....	82

Liste des tableaux

		Page
Tab. 01	Composants décimales du système de nomenclature du développement de feuille et organe reproducteur de <i>Medicago truncatula</i>	11
Tab.02	Origines des lignées de <i>M. truncatula</i> étudiées.....	38
Tab.03	Distribution des marqueurs sur les 8 groupes de liaison.....	58
Tab.04	Analyse de variance (carrés moyens) pour la vigueur hivernale de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	63
Tab.05	Analyse de variance (carrés moyens) pour la vigueur printanière de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	64
Tab.06	Analyse de variance (carrés moyens) pour la longueur du rameau principale de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	64
Tab.07	Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre de ramifications primaires de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	65
Tab.08	Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre d'entre-nœuds de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	65
Tab.09	Analyse de variance (carrés moyens) pour l'envergure de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	65
Tab.10	Analyse de variance (carrés moyens) pour la date de floraison de la population RILs de <i>M. truncatula</i> en 2013 et 2014.....	66
Tab.11	Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre de graines par gousse de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.....	66
Tab.12	Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre de gousses par plante de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.....	67
Tab.13	Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids total des gousses par plante de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.....	67
Tab 14	Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids total des graines par gousse de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2014.....	68
Tab.15	Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids moyen des gousses de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.....	68
Tab.16	Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids moyen des graines de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.....	69
Tab.17	Analyse de variance (carrés moyens) pour la longueur du rameau principal en fin de cycle de la population RILs de <i>M. truncatula</i> sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.....	69
Tab.18	QTL de caractères notés avant l'application du stress hydrique.....	74

Tab.19 :	QTL détectés pour le nombre de graines par gousse en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	76
Tab.20 :	QTL détectés pour le nombre total de gousses par plante en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	76
Tab.21 :	QTL détectés pour poids total des gousses par plante en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	77
Tab.22 :	QTL détectés pour le poids total des graines par gousse en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	78
Tab.23 :	QTL détectés pour le poids moyen des gousses en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	79
Tab.24 :	QTL détectés pour le poids moyen des graines en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	80
Tab.25 :	QTL détectés pour la longueur du rameau principal en fin de cycle en condition irrigué et en stressé (2013-2014).....	81

TABLE DES MATIERES

Introduction générale : Contexte de l'étude et présentation des objectifs	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	05
1. Les légumineuses.....	05
2. Le genre <i>Medicago</i> et l'espèce <i>M. truncatula</i>	06
2.1. Genre <i>Medicago</i>	06
2.2. Caractéristiques de l'espèce <i>Medicago truncatula</i>	07
2.3. Le choix de <i>Medicago truncatula</i> comme modèle des légumineuses.....	08
2.4. Développement végétative et reproducteur.....	09
3. Ressources biologiques et outils disponibles chez <i>Medicago truncatula</i> pour l'étude du déterminisme génétique	12
3.1. Diversité naturelle disponible chez <i>Medicago truncatula</i>	12
3.2. Analyse du déterminisme génétique par cartographie de QTL.....	13
3.2.1. Cartographie des QTL.....	13
3.2.2. Marqueurs moléculaires.....	14
3.2.3. Carte génétique.....	15
3.2.4. Populations en ségrégation.....	16
3.2.5. Phénotypage d'une population.....	18
3.3. Modèles et outils de recherche de QTLs.....	18
3.3.1. La méthode de détection marqueur par marqueur.....	18
3.3.2. Méthodes de cartographie d'intervalle.....	19
3.3.2.1. Cartographie d'intervalle simple (Simple Interval Mapping, SIM).....	19
3.3.2.2. Cartographie d'intervalle composite (Composite Interval Mapping, CIM).....	20
3.3.3. Paramètres estimés lors d'une recherche de QTL.....	21
3.3.3.1. L'intervalle de confiance du QTL (IC).....	21
3.3.3.2. L'effet additif du QTL.....	21
3.3.3.3. La part de variation phénotypique (R ²).....	21
4. Effet de la sécheresse sur les plantes et stratégie d'adaptation	21
4.1. Définition de la sécheresse.....	21
4.2. Réponse des plantes à la sécheresse.....	22
4.2.1. L'esquive.....	23
4.2.2. L'évitement.....	24
4.2.3. La tolérance.....	25
4.3. Méthodes d'étude et d'application du déficit hydrique.....	25
4.4. Phénotypage sur le terrain ou dans un milieu contrôlé ?.....	27
5. Les nouvelles méthodes de sélection des plantes vis-à-vis de la sécheresse	29
5.1. Avantages et limites d'utilisation des QTL de résistance à la sécheresse dans la sélection.....	30
5.2. L'exploitation des espèces sauvages apparentées dans la détermination de QTL pour la sélection.....	31
Chapitre II : Déterminisme génétique de caractères végétatifs et de fitness en réponse à un stress hydrique chez <i>M. truncatula</i>	34
1. Introduction	34
2. Matériels et méthodes	36
2.1. Conduite de la culture.....	36
2.2. Méthode d'application du stress hydrique.....	37
2.3. Détermination du taux de tarissement de l'eau du sol.....	37
2.4. Matériel végétal.....	38
2.5. Dispositif expérimental.....	39
2.6. Caractères étudiés.....	39
2.7. Analyses statistiques.....	40
3. Résultats	40
3.1. Analyse de variance et effet du stress sur les paramètres notés.....	40

3.1.1.	Longueur du rameau (LB)	40
3.1.2.	Nombre d'entrenœud (IN)	41
3.1.3.	Date de floraison (FD)	42
3.1.4.	Nombre de graines par gousse (MSN)	43
3.1.5.	Nombre total de gousses (TPN)	44
3.1.6.	Poids total des gousses (TPW)	45
3.1.7.	Nombre total de graines par plante (TSNP)	46
3.1.8.	Poids moyen des gousses (MPW)	46
3.1.9.	Nombre de gousses sur les deux tiges principales (NP3)	47
3.2.	Analyses de corrélations.....	48
3.3.	Analyse en composante principale.....	50
3.4.	Classification ascendante hiérarchique (CAH)	52
4.	Discussion et conclusion générale.....	53

Chapitre III : Variabilité génétique et identification de QTLs de caractères morphologiques et de fitness chez *M. truncatula*.....56

1.	Introduction.....	56
2.	Matériels et méthodes.....	57
2.1.	Conduite de l'essai.....	57
2.2.	Matériel végétal.....	57
2.3.	Carte génétique	58
2.4.	Dispositif expérimental.....	58
2.5.	Caractères étudiés.....	60
2.5.1.	Les caractères notés avant application du stress hydrique.....	60
2.5.2.	Les caractères notés après application du stress hydrique.....	60
2.6.	Analyses statistiques et analyses QTL.....	61
2.6.1.	Analyses de variance.....	61
2.6.2.	Analyses QTL.....	61
3.	Résultats.....	62
3.1.	Confirmation de la carte génétique.....	62
3.2.	Analyse de variance et effet du stress sur les paramètres notés.....	63
3.2.1.	Paramètres notés avant application du stress hydrique.....	63
3.2.1.1.	Vigueur hivernale (WV)	63
3.2.1.2.	Vigueur printanière (SV)	64
3.2.1.3.	Longueur du rameau principal (LB0)	64
3.2.1.4.	Nombre de ramifications primaires (NB)	64
3.2.1.5.	Nombre d'entrenœuds (INO)	65
3.2.1.6.	Envergure (SP)	65
3.2.1.7.	Date de floraison (FD)	66
3.2.2.	Paramètres notés après application du stress hydrique.....	66
3.2.2.1.	Nombre de graines par gousse (MSN)	66
3.2.2.2.	Nombre de gousses par plante (TPN)	67
3.2.2.3.	Poids total des gousses par plante (TPW)	67
3.2.2.4.	Poids total des graines par gousse (TWSP).....	68
3.2.2.5.	Poids moyen des gousses (MPW)	68
3.2.2.6.	Poids moyen des graines (MSW)	69
3.2.2.7.	Longueur du rameau principal en fin de cycle (LB3)	69
3.3.	Analyses de corrélations	70
3.3.1.	Caractères avant application du stress hydrique.....	70
3.3.2.	Caractères après application du stress hydrique.....	71
3.4.	Localisation et identification des QTL.....	73
3.4.1.	paramètres notés avant application du stress hydrique.....	74
3.4.2.	Paramètres notés après application du stress hydrique.....	74
3.4.2.1.	Nombre de graines par gousse (MSN)	75
3.4.2.2.	Nombre total de gousses par plante (TPN)	76
3.4.2.3.	Poids total des gousses par plante (TPW)	77

3.4.2.4.	Poids total des graines par gousse (TWSP)	78
3.4.2.5.	Poids moyen des gousses (MPW)	79
3.4.2.6.	Poids moyen des graines (MSW)	80
3.4.2.7.	Longueur du rameau principal en fin de cycle (LB3)	81
4.	<u>Discussion.....</u>	82
4.1.	Variation génétique.....	82
4.2.	Analyse des corrélations.....	83
4.3.	Héritabilité.....	83
4.4.	Cartographie des QTL.....	83
	<u>Synthèse générale et perspectives.....</u>	87
	Références Bibliographiques.....	91

Annexes

Introduction générale : Contexte de l'étude et présentation des objectifs

Les modèles climatiques prédisent une augmentation de la gravité et la fréquence de la sécheresse dans les 50 prochaines années (Dai *et al.* 2012). Ce changement est particulièrement difficile pour les plantes, car elles doivent être en mesure de faire face à des fluctuations environnementales importantes, tout en conservant leur développement (Kooyers 2015). Ainsi, pour les plantes cultivées, la disponibilité de l'eau est l'un des principaux obstacles à leur croissance. Développer des cultures plus tolérantes au déficit hydrique, tout en maintenant une bonne productivité, deviendra une exigence essentielle pour l'amélioration de l'agriculture dans le XXI^e siècle (Boyer, 1982).

Depuis des années, une multitude de recherches ont été faites pour disséquer le comportement des plantes vis-à-vis des stress liés à la sécheresse (Levitt 1980; Ludlow 1989; Blum 1996, 2011; Blum *et al.* 2005; Cattivelli *et al.* 2008; Tardieu *et al.* 2014). Mais alors que les mécanismes physiologiques et les aspects génomiques contrôlant la résistance des plantes cultivées à la sécheresse ont été intensément étudiés, moins de recherches ont examiné les bases génétiques de l'adaptation à la sécheresse des populations naturelles (Kooyers, 2015).

Les populations sauvages constituent un grand réservoir de diversité génétique et phénotypique et peuvent être, par conséquent, une bonne source pour découvrir de nouveaux mécanismes d'acquisition de résistance à la sécheresse (Anderson *et al.*, 2011). Dans la pratique, de très bons résultats ont été obtenus sur des plantes cultivées en leur introduisant des caractères de résistance à la sécheresse par des croisement avec des espèces apparentées sauvages (Bartels and Sunkar, 2005).

Les plantes méditerranéennes ont appris à faire face régulièrement aux stress dus à la sécheresse et ont développé une multitude de caractéristiques morphologiques, anatomiques, biochimiques et physiologiques qui leurs permettent de s'adapter et de survivre dans les conditions difficiles (Tattini and Loreto, 2014).

L'espèce *Medicago truncatula* qui vit naturellement dans les milieux arides et semi-arides du bassin méditerranéen peut être considérée comme une espèce adaptée à la sécheresse et un modèle expérimental idéal pour faire avancer notre compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent aux légumineuses, et aux plantes en général, de s'adapter et de tolérer la sécheresse (Zhang *et al.*, 2014).

Les légumineuses représentent la deuxième plus grande famille après les graminées en matière d'importance pour l'agriculture. Leur importance aujourd'hui est due essentiellement au fait qu'elles constituent des modèles de plantes, importantes pour l'étude de la physiologie, de la génomique, l'interaction plante-microbe, l'agriculture durable, la production alimentaire, la sécurité et la production de bioénergie renouvelable (Li *et al.*, 2012).

Cependant, bien que plus de 20 000 espèces constituent cette famille (Doyle and Luckow, 2003), deux seulement ont été choisies pour servir de modèles pour la recherche expérimentale : *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* (Choi *et al.*, 2004). L'objectif majeur à travers ce choix était d'intégrer les connaissances tirées de l'étude des génomes de ces plantes modèles pour améliorer les performances agronomiques des espèces cultivées économiquement importantes (Young and Udvardi, 2009). En effet, des recherches récentes ont permis de mettre en évidence une syntenie entre les légumineuses modèles et les espèces de légumineuses cultivées comme la luzerne (*Medicago sativa*), le trèfle rouge et blanc (*Trifolium pratense* et *T. repens*, respectivement), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*), et la féverole (*Vicia faba*) (Young *et al.*, 2005 ; Young and Udvardi, 2009).

Le choix de *Medicago truncatula* a été dicté par plusieurs raisons très importantes. Cette espèce dispose d'un génome de petite taille (500-550 Mbp), d'organisation simple, facile à manipuler (Barker *et al.*, 1990). C'est une espèce annuelle, diploïde ($2n=16$) et autogame, elle a un cycle de vie court et produit des gousses et des graines en abondance (May and Dixon, 2004) et rentre en symbiose avec les rhizobiums. Elle dispose aussi d'une diversité génétique naturelle très importante, adaptée aux différentes situations environnementales (Bataillon and Ronfort, 2006 ; Ronfort *et al.*, 2006).

Contrairement aux plantes résistantes aux stress biotiques, dont les caractères sont souvent monogéniques, les réponses des plantes aux stress abiotiques sont génétiquement plus complexes et sont multigéniques, donc plus difficiles à contrôler et à manipuler (Vinocur and Altman, 2005). L'évolution de la génomique et de la bioinformatique offrent de réelles opportunités pour disséquer les caractères intervenant dans la tolérance à la sécheresse, puis utiliser des approches génomiques pour sélectionner des plantes avec des allèles favorables aux gènes sous-jacents (Okono *et al.*, 2013). L'utilisation de la technique de détection de QTL, constitue l'une des approches retenues pour comprendre le déterminisme génétique de la tolérance à la sécheresse chez les plantes (Vinocur and Altman, 2005) surtout pour les caractères de rendement (plantes cultivées) et/ou de fitness (plantes sauvages).

Dans ce contexte, l'objectif de notre thèse est d'identifier les déterminants génétiques (QTL) pour des caractères de fitness chez *Medicago truncatula* en réponse à un stress hydrique cyclique et progressif de fin de cycle (post floraison) en exploitant la variabilité génétique naturelle existante. La démarche développée consiste à :

- décrire la variabilité génétique existante pour des caractères de fitness en réponse à un stress hydrique chez quelques lignées de *M. truncatula* (Chapitre II) ;
- rechercher des QTL (Quantitative Trait Locus) pour des caractères de fitness dans des conditions de contrôle et de stress hydrique (Chapitre III).

La synthèse bibliographique (Chapitre I) rappellera tout d'abord l'importance de *M. truncatula* comme espèce modèle de la famille des légumineuses et des ressources génétiques disponibles ; ensuite les méthodes utilisées pour le déterminisme génétique par cartographie de QTL et exposera des notions importantes sur le stress hydrique, les méthodes de l'appliquer et l'utilisation des QTL pour la sélection à la tolérance à la sécheresse.

A la fin du manuscrit, une réflexion sera proposée sur les perspectives à venir.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les légumineuses

Les Légumineuses constituent la deuxième plus grande famille botanique après la famille des graminées. Elle compte environ 20 000 espèces, réparties en 3 sous-familles : les Césalpiniées, les Mimosacées et les Papilionacées (Doyle and Luckow, 2003). Les Légumineuses cultivées appartiennent aux Papilionacées (Fig. 1) et se répartissent, pour la plupart, sur deux clades : les Phaseolides, d'origine tropicale (e.g. le soja *Glycine max*, le haricot commun *Phaseolus vulgaris*, le haricot mungo *Vigna radiata*) et les Galégoïdes d'origine tempérée (e.g. le pois *Pisum sativum*, la lentille *Lens culinaris*, la luzerne cultivée *Medicago sativa*) qui comptent aussi les espèces annuelles du genre *Medicago* dont *Medicago truncatula*.

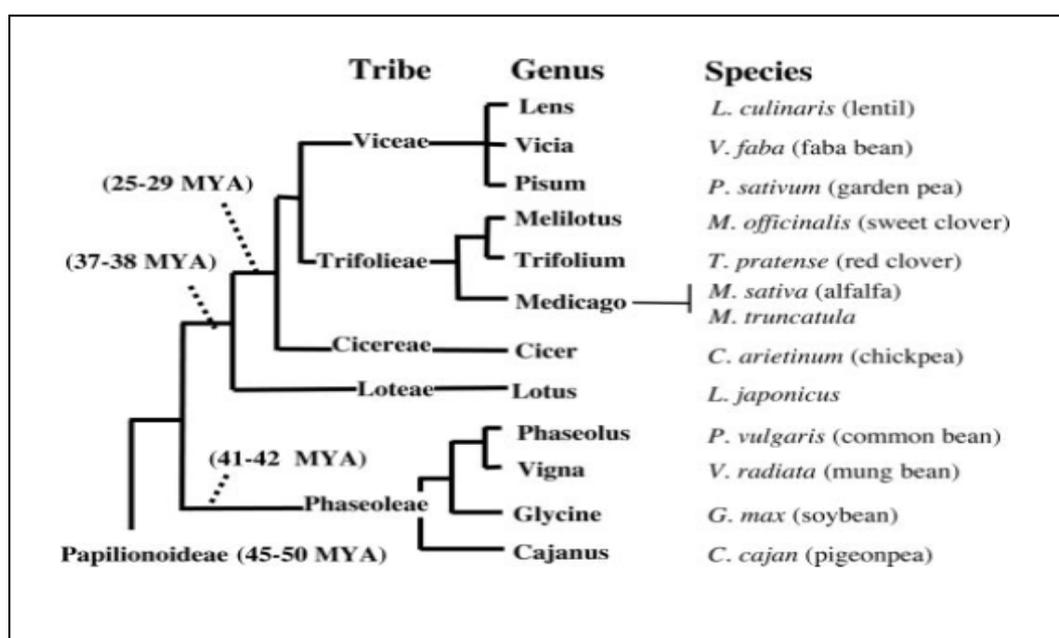


Fig. 1 : Relation phylogénique entre les tribus, genres et espèces de la sous-famille des *Papilionoideae* (Choi *et al.*, 2004)

Les légumineuses (Fabacées) représentent l'un des taxons végétaux les plus importants, tant du point de vue de la biologie et de l'écologie fondamentale que du point de vue agronomique et environnemental (Journet *et al.*, 2001). Les Légumineuses ont une particularité biologique très importante qui se manifeste par leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiacées), pour former des organes symbiotiques racinaires, "nodosités" ou "nodules", au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante (Mylona *et al.*, 1995), comme elles peuvent s'associer à des champignons symbiotiques pour former des endomycorhizes (Gianinazzi-Pearson, 1996).

Les légumineuses peuvent aussi avoir des interactions avec des pathogènes et des ravageurs (insectes, nématodes), former des graines protéagineuses, produire des métabolites secondaires spécifiques à grand intérêt pharmaceutique (Bell *et al.*, 2001).

Les légumineuses constituent une source très importante en protéines végétales utilisées pour l'alimentation humaine et animale. Elles représentent aussi une source importante d'azote et jouent par conséquent un rôle essentiel à la fois dans la structure des écosystèmes et dans la réalisation de l'agriculture durable, dans le monde entier (Dita *et al.*, 2006). Elles permettent aussi une économie de dépenses due au fait qu'elles fixent l'azote atmosphérique, réduisant ainsi le besoin d'engrais chimiques, tout en améliorant la productivité globale des cultures. Dans les systèmes agricoles, les légumineuses sont souvent utilisés comme une interculture « inter cropping » (par exemple, combinée avec des céréales), en mixture « mixed cropping » ou dans les rotations des cultures (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2008). Ces pratiques d'utilisation des légumineuses ont pour résultante la diminution des ravageurs, des maladies et des populations de mauvaises herbes (Perrin and Phillips 1978). Elles permettent aussi l'amélioration de la productivité et les revenus des petits exploitants agricoles (Zorn and Lips 2016).

2. Le genre *Medicago* et l'espèce *M. truncatula*

2.1. Genre *Medicago*

Le genre *Medicago* appartient à l'ordre des *Fabales*, superfamille des Légumineuses, famille des *Fabaceae* et sous-famille des *Faboideae*. Le genre *Medicago* fait parti de la tribu des *Trifolieae* qui comprend la majorité des légumineuses fourragères tempérées, comme la luzerne cultivée et le trèfle, et qui est phylogénétiquement proche de la tribu des *Vicieae* incluant les Légumineuses à graines (Fig. 2) comme le pois (*P. sativum*) et la féverole (*Vicia faba*) (Doyle and Luckow 2003).

Le genre *Medicago* est très proche des genres *Melilotus* et *Trigonella*. Il a été classé sur la base de la morphologie des gousses et des graines en quatre sous-genres (Fig. 2) : *Orbicularia*, *Medicago*, *Lupularia* et *Spirocarpos* (Lesins and Lesins, 1979).

Originaire du croissant fertile, le genre *Medicago* a conquis tous le bassin méditerranéen et ces environs steppiques (Delalande *et al.*, 2007). Puis les autres continents, en particulier l'Amérique et l'Australie.

Soutenues par des programmes nationaux ou internationaux, différentes accessions de *Medicago*, originaires de leur centre d'origine ou bien de leurs centres de diversité, ont été collectées suite à plusieurs prospections.

Un total de 9 453 populations a été répertorié sur la base des quatre principales collections (SARDI, INRA, ARS-USDA et LILM-CBBC) : 5 703 populations de *M. truncatula*, 2 887 populations de *M. littoralis* and 863 populations de *M. italica*. L'espèce *Medicago truncatula* représente à elle seule 60,4% des 3 espèces collectées.

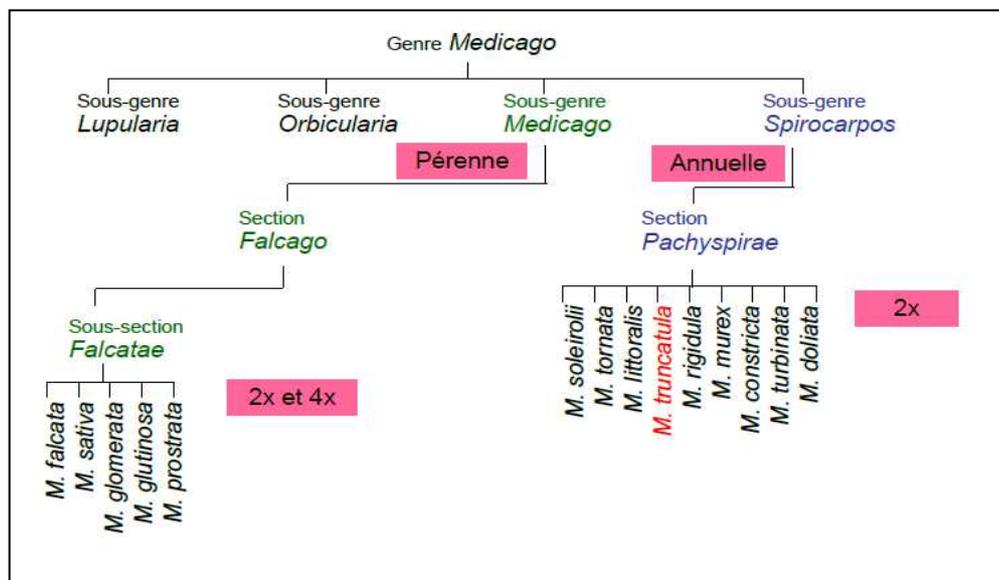


Fig. 2 : Taxonomie du genre *Medicago*. Tiré de Pierre (2008)

2.2. Caractéristiques de l'espèce *M. truncatula*

C'est une espèce velue, à port variable, souvent prostré, de taille intermédiaire (15 à 80 cm). Le pédoncule est plus court que le pétiole (Fig. 3) et l'inflorescence porte de une à cinq fleurs jaunes groupées en racèmes (Lesins and Lesins, 1979). Les folioles de 8 à 15 mm de long et 7 à 12 mm de large, les stipules sont dentées (Small, 2011). Les gousses sont cylindriques (7 - 12 mm de diamètre), glabres, très dures, à spires (3.5 - 6) jointives et serrées, aux épines recourbées, souvent perpendiculaires au plan des spires. Elles contiennent de trois à douze graines. Le poids de 1 000 graines varie de 3.3 à 6 g (Pierre 2008).

C'est une espèce qui se caractérise par une bonne tolérance à la sécheresse et à la salinité et pousse dans une large gamme de sols et de conditions environnementales (Huguet and Prospero, 1996).

M. truncatula, comme toutes les espèces annuelles du genre *Medicago*, a un très grand potentiel agronomique. Elle peut être cultivée pour atténuer l'effet de l'érosion sur les sols et améliorer leur fertilité, mais aussi comme ressource fourragère hivernale très importante (Abdelguerfi and Abdelguerfi-Laouar 2004). Son intérêt agronomique et d'autant plus important qu'elle peut se ressemer spontanément dans la nature. Ces graines très dures peuvent persister longtemps dans le

sol lui permettant une installation permanente, bien adaptée aux différentes conditions climatiques méditerranéennes (Nunes *et al.*, 2008).

Dans les climats méditerranéens, la croissance végétative se produit principalement à la fin de l'automne, en hiver et au début du printemps; sous des températures fraîches; et avec de courtes photopériodes. La floraison a lieu au printemps et les plantes mûrissent à la fin du printemps ou au début de l'été (Garmier *et al.* 2017).

M. truncatula est une espèce qui vit sur des sols de différentes structures, allant des sols sableux aux sols limoneux (Abdelguerfi *et al.* 1988; Small 2011). C'est une plante adaptée à des précipitations allant de 250 à 600 mm par an, réparties généralement en milieu d'hiver et au printemps. Par contre, en Algérie, elle se développe dans les régions qui reçoivent des précipitations comprises entre 150 et 450 mm et sa fréquence augmente avec l'altitude (Abdelguerfi *et al.* 1988). C'est la plus importante espèce annuelle utilisée comme fourrage en Australie dans le système 'leyfarming', couvrant plus de 4.5 millions d'hectares (Pearson *et al.*, 1997 *in* Small, 2011). Un rendement en graines de plus de 1 330 Kg/ha pour le cultivar 'Jemalong' a été réalisé dans une zone littorale en Algérie (Kernick, 1978 *in* Small, 2011). En France, elle est utilisée avec d'autres espèces pour restaurer la fertilité des terres marginales et comme source en fourrage hivernales (Huguet and Prospero, 1996).

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

L'espèce *M. truncatula* a été proposée pour la première fois par Barker *et al.* (1990) comme espèce modèle pour l'étude de la génétique moléculaire de l'association symbiotique rhizobia-légumineuse. Le choix a été porté sur le cultivar australien Jemalong comme premier objet d'étude. Le choix de Jemalong qui est largement cultivé en Australie comme fourrage a été principalement dû à la forte faculté de régénération *in vitro* (Barker, 1990). L'espèce *M. truncatula* ($2n=2x=16$) est diploïde et autogame. Elle possède un génome relativement petit (~500 mpb) et un cycle de vie très court qui est d'environ 3 mois en conditions de jours longs (Barker *et al.*, 1990). Ces caractéristiques intéressantes ont favorisé le choix de *M. truncatula* comme espèce modèle à la place de l'espèce cultivée *M. sativa* (luzerne) qui est allopolyploïde, pérenne et autotétraploïde. Ces caractéristiques génétiques, de reproduction..., ont permis à *M. truncatula* d'être l'outil idéal pour les analyses moléculaires et génétiques. Elle a l'avantage aussi d'être du point de vue phylogénique plus proche des principales légumineuses cultivées (Choi *et al.*, 2004). En effet, elle présente un fort degré de synténie avec la luzerne (*Medicago sativa*), le petit pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*) et le lotier (*Lotus japonicas*), ainsi qu'avec le soja et les différentes espèces du genre *Phaseoleae* (Choi *et al.*,

2004 ; Young *et al.*, 2005 ; Rispaïl *et al.*, 2010 ; Cruz-Izquierdo *et al.*, 2012). Ceci a renforcé la possibilité de transférer les résultats de cartographie obtenus chez cette espèce modèle sur d'autres espèces qui ont un intérêt agronomique et dont la taille du génome est plus importante.

La première carte génétique publiée de *M. truncatula* a été développée par Thoquet *et al.* (2002) en utilisant deux lignées homozygotes sélectionnées à partir de Jemalong (J6) et de la population naturelle Algérienne DZA 315 .

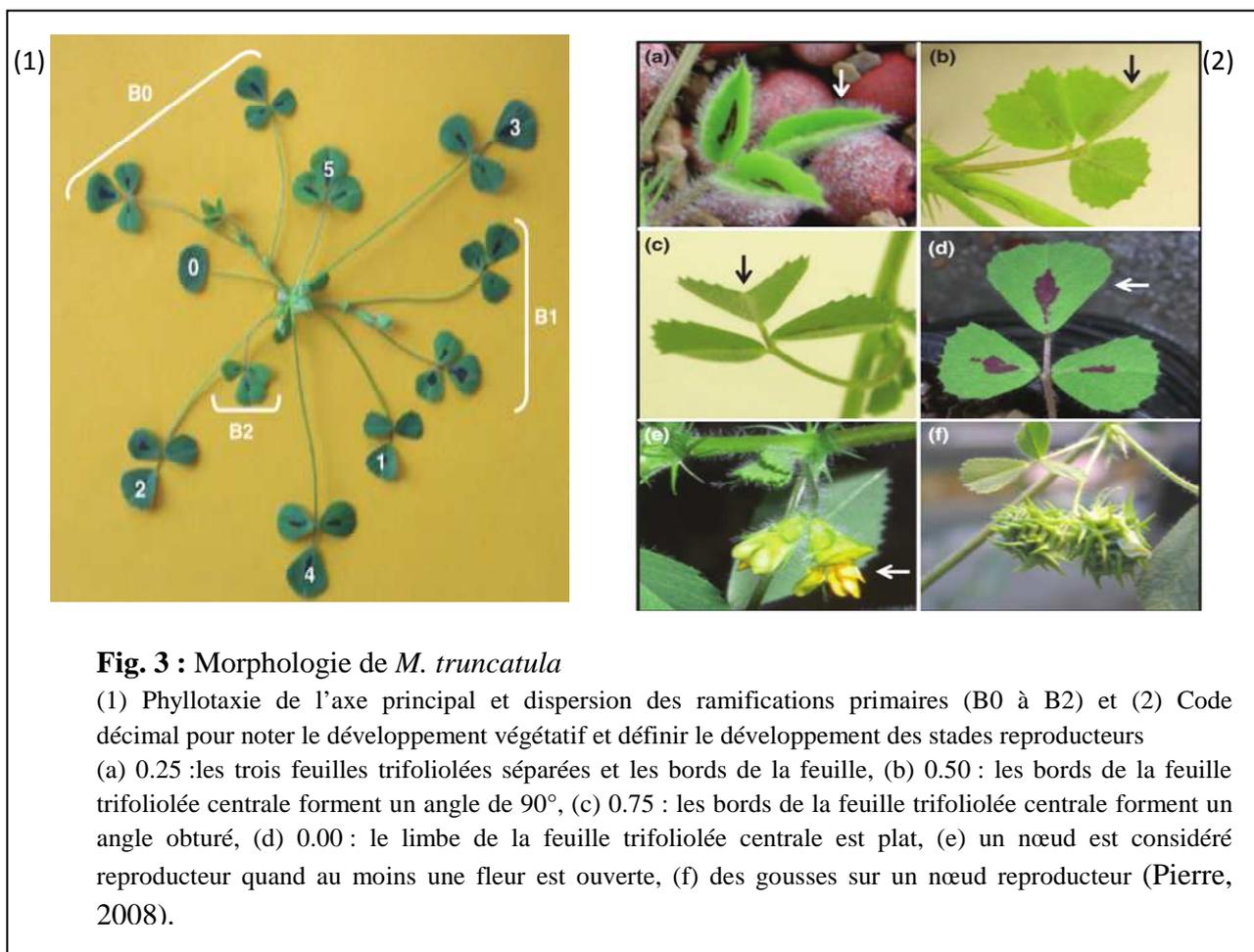
Medicago truncatula est aussi une espèce très appropriée pour comprendre les interactions plantes - environnements. Parmi les stress qui ont été étudiés, il y a le stress salin qui a fait l'objet de plusieurs études sur *M. truncatula* (Merchan *et al.*, 2007 ; Arraouadi *et al.*, 2010, 2012 ; Zahaf *et al.*, 2012 ; Foroozanfar *et al.*, 2014), le stress lié au déficit hydrique (manque d'eau) (Vandecasteele *et al.*, 2011 ; Badri *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2014 ; Kang *et al.*, 2015) et le stress au froid (Avia *et al.*, 2013a), ainsi que d'autres stress biotiques (Ben *et al.*, 2013).

2.4. Développement végétative et reproducteur

L'espèce *M. truncatula* a été très bien décrite à travers différents travaux (Djemel *et al.*, 2005 ; Wang and Grusak 2005 ; Moreau *et al.*, 2007), ce qui a permis de mieux comprendre les étapes de son développement et de sa croissance. Ces travaux, ont permis de caractériser les feuilles, les tiges, les organes reproducteurs, les gousses et les graines.

Les stades végétatifs sont décrits par le nombre de feuilles trifoliolées déployées par axe ainsi que par le nombre d'entre-nœuds (Fig. 3).

Les stades reproducteurs (Fig. 3) sont quant à eux déterminés par (i) l'identification de la position du premier nœud reproducteur pour chaque axe et (ii) le nombre de nœuds reproducteurs par axe (Moreau *et al.*, 2006). Cette méthode de notation a l'avantage de permettre une caractérisation phénotypique plus complète qu'une simple description à l'échelle d'un organe individuel. (Pierre, 2008).



Une autre caractérisation a été établie par Bucciarelli et al. (2006) où la première feuille (unifoliée) porte la notation m1 (premier métamère) et sert de référence pour la détermination du développement phénotypique de l'espèce. La deuxième feuille (trifoliée) est associée au métamère m2 se positionne à un angle égale à 180° de m1 et ainsi de suite. Le premier rameau axillaire se développe parallèlement à m4 et il est associé à m1 (m1.1 : le rameau secondaire est identifié par métamère qui le soutien « m1 » alors que le deuxième code est affecté en fonction de l'ordre de son apparition « 1 ») (Fig. 4)

Afin de décrire minutieusement l'état de croissance de l'organe depuis son apparition jusqu'à sa maturité, une composante décimale a été proposé (Tab. 1).

Tab. 1 : Composants décimales du système de nomenclature du développement de feuille et organe reproducteur de *Medicago truncatula* (Bucciarelli et al. 2006)

Code décimal	Etape de développement de la feuille	Code décimal	Etape de développement de l'organe reproducteur
0.1	Etalement du bourgeon	0.1	Eclatement du bourgeon
0.2	Jeune pousse difficile à décerner, visible	0.2	Pétales visibles, verts
0.3	Jeune pousse perceptible, petite	0.3	Pétales visibles, jaunes (fermés)
0.4	Brin plié, pétiole visible	0.4	Pétales ouverts
0.5	Jeune pousse entre ouverte	0.5	Pétales sénescents
0.6	Jeune pousse plus qu'entre ouverte	0.6	Gousse visible
0.7	Jeune pousse presque entièrement ouverte	0.7	Gousse petite (1-5 mm de long)
0.8	Jeune feuille entièrement ouverte, verte	0.8	Gousse moyenne (> 5 mm de long), vertes
0.9	Jeune feuille entièrement ouverte, bleu-vert	0.9	Gousse de taille complète, marron

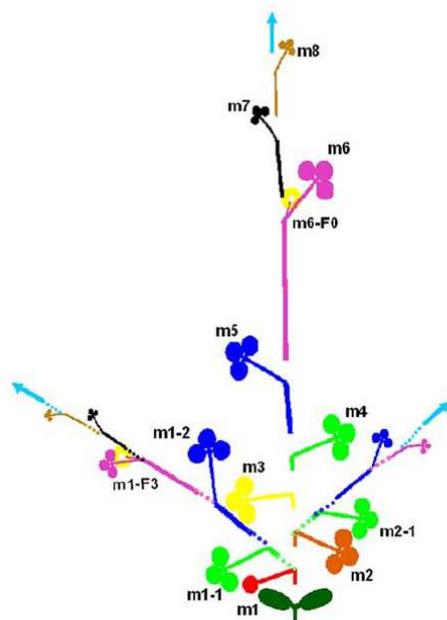


Fig. 4 : Diagramme schématisé de *Medicago truncatula*, illustrant le système de codage de la nomenclature numérique. Les métamères sont colorés différemment le long de la pousse principale et des pousses axillaires ; la position d'apparition des fleurs est indiquée avec un « F ». Les structures qui partagent la même couleur apparaissent simultanément (Bucciarelli et al. 2006).

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

3.1. Diversité naturelle disponible chez *Medicago truncatula*

Medicago truncatula GAERTN est décrite par Lesins and Lesins (1979) comme étant une plante d'origine méditerranéenne, qui a été naturalisée dans d'autres pays du monde en suivant les flux migratoires européennes. Elle est originaire du « Croissant Fertile » recouvrant la Turquie, l'Irak, l'Iran, le sud du Caucase et les pays méditerranéens limitrophes. C'est une plante opportuniste, qui a su coloniser les espaces ouverts et elle peut être qualifiée de population éphémère (Bataillon and Ronfort, 2006). Elle est présente dans des biotopes très variés (Prosperi *et al.*, 1993). Bien que *M. truncatula* soit autogame, il existe une forte variabilité génétique au niveau de cette espèce, due notamment à sa dynamique de dispersion (Ronfort *et al.*, 2006).

Plus de 5 700 accessions ont été recensées et conservées dans les principales collections et centre de ressources biologiques : AMGRC-SARDI, INRA, ARS-USDA, LILM-CBBC et Samuel Roberts Noble Foundation (<http://www.noble.org/MedicagoHandbook>, 2006). Ces accessions sont principalement issues d'Algérie d'Espagne, de France, de Grèce, du Maroc, du Portugal et de Tunisie. Afin de préserver l'intégrité génétique de ces accessions naturelles et variétés cultivées tout en conservant un nombre restreint de génotypes, une core-collection a été constituée de 346 lignées fixées issues des collections australiennes (AMGRC-SARDI) et françaises (INRA Montpellier). Ces lignées ont été retenues en raison de la diversité de leur origine géographique et de leur diversité génétique étudiée à partir de marqueurs microsatellites (Ronfort *et al.*, 2006).

La prospection réalisée, en Algérie, en 1988 par l'ITGC, l'INRA Montpellier et l'INA El Harrach (actuellement ENSA) (Abdelguerfi 2002), a permis la collecte de 110 populations dans tout le pays au nord de la zone steppique, afin de couvrir au mieux la variabilité des conditions de climat et de sol (Garmier *et al.* 2017). Certaines lignées algériennes de cette collection sont intégrées dans le projet HapMap (Carte Haplotype), par le biais de l'INRA Montpellier, sur le séquençage de *M. truncatula*, en vue d'explorer la génétique de la symbiose-légumineuse sachant que *M. truncatula* est l'espèce modèle des légumineuses. L'étude du génome de *Medicago truncatula* donnera un aperçu sur l'évolution des symbioses rhizobiennes (Young *et al.* 2011).

Il est à noter, qu'une prospection a été réalisée en 1975, en Algérie, sur les *Medicago* par l'INA (actuellement ENSA). Deux cent deux (202) sites de collecte ont été visités. *M. truncatula* a été l'espèce la plus fréquente, après *M. polymorpha* (Abdelguerfi 1976, 1978, 2002). Cette espèce a une large dispersion en Algérie, elle s'adapte à différents types de sols et sous différentes pluviométries (Abdelguerfi et al. 1988; Abdelguerfi 2002). La collection de *M. truncatula* (81 populations) fait l'objet d'une étude morphologique, phénologique et moléculaire est cela depuis 2012 dans le cadre d'un projet Tassili et d'une bourse Profas.

3.2. Analyse du déterminisme génétique par cartographie de QTL

Cette partie présente une revue des méthodes utilisées pour la détection de QTL par analyse de liaison.

3.2.1. Cartographie des QTL

La plupart des caractères d'intérêt agronomiques (caractères quantitatifs) sont polygéniques (plus complexes) comparés aux caractères mendéliens (caractères qualitatifs) qui sont contrôlés par un gène ou deux. Ils existent des interactions fortes entre ces gènes : soit entre des allèles du même locus (dominance) soit entre différents loci (épistasie) (Meiss, 2006). Les méthodes classiques de sélection ont révélé que la tolérance au stress hydrique est exprimée par des caractères quantitatifs, ce qui rend la sélection génétique vis-à-vis du stress hydrique très complexe (Bartels and Sunkar, 2005).

Le principe de la cartographie est de localiser un locus (ou groupe de locus) dont la variation allélique est associée à la variation d'un caractère quantitatif. Ce locus (ou loci) s'appelle locus de caractère quantitatif ou QTL « *Quantitative Trait Locus* ». La présence d'un QTL est conclue quand sont observées des différences phénotypiques significatives entre individus qui ont hérité différents allèles, liées à des marqueurs, de leurs parents (Roldan, 2011).

Le principe de base de la cartographie des QTL est relativement simple et consiste en deux étapes (Liu, 1998):

1. Construire une carte génétique dense de l'ensemble du génome, en se basant sur les fréquences de recombinaison entre les différents marqueurs moléculaires répartis sur les chromosomes (groupes de liaisons).
2. Rechercher la présence de corrélations significatives entre les valeurs phénotypiques (enregistrées) du caractère et l'état allélique de chaque marqueur moléculaire (neutre). Si la corrélation est positive cela indique qu'une région du chromosome qui est proche du

marqueur doit contenir un loci à effet quantitatif (QTL). Cette corrélation sera d'autant plus forte, que :

- i) le QTL recherché est proche du marqueurs moléculaire, c'est à dire en fort déséquilibre de liaison avec le marqueur ;
- ii) le QTL a un effet important sur le caractère.

La cartographie des QTL nécessite donc 4 « ingrédients » (Meiss, 2006) :

- 1) des **marqueurs** moléculaires polymorphes couvrant, si possible, tout le génome pour construire une **carte génétique** et pour établir des liaisons avec des QTL,
- 2) Des mesures d'un **caractère phénotypique recherché**,
- 3) une **population d'étude** en ségrégation pour le caractère recherché et les marqueurs moléculaires,
- 4) des **outils statistiques** pour trouver des associations entre les états alléliques liées aux marqueurs et les valeurs du caractère phénotypique (Doerge *et al.*, 1997).

3.2.2. Marqueurs moléculaires

Un marqueur génétique peut être défini comme un gène ou une séquence polymorphe d'ADN , facilement détectable grâce à son emplacement connu sur le chromosome .Ces marqueurs peuvent être utilisés pour différencier les individus, les espèces, les genres, les variétés,... (Pace *et al.*, 2013).

Un marqueur moléculaire, devrait idéalement présenter les caractéristiques suivantes (Santoni *et al.*, 2000) :

- i) Être **polymorphe**, c'est à dire posséder plus d'un allèle dans la population étudiée.
- ii) Être **codominant**, ce qui signifie qu'un hétérozygote peut être différencié des homozygotes c'est-à-dire absence d'interaction intra locus.
- iii) Non **épistatique**, c'est-à-dire que son génotype peut être lu à partir de son phénotype quel que soit le génotype des autres locus (absence d'interaction inter locus).
- iv) Être **neutre**, c'est-à-dire que son polymorphisme est sans effet sur la variabilité phénotypique.

- v) Être **insensible au milieu**, c'est-à-dire le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu.

De nombreuses techniques de marquage moléculaire sont aujourd'hui disponibles, et de nouvelles sont régulièrement publiées (De Vienne, 1998). Deux d'entre elles sont particulièrement utilisées actuellement : les *microsatellites* et les « *single nucléotide polymorphisms* » (SNP). Les microsatellites ou SSR « *Simple Sequence Repeats* » sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tetra nucléotidiques. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, etc., la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. A la différence des SSR, les SNP ont des polymorphismes concernant une seule base d'ADN. Dû aux faibles taux de mutation, ils sont le plus souvent bialléliques. Les SNP sont extrêmement nombreux et leur génotype est facilement automatisable.

3.2.3. Carte génétique

L'établissement des cartes génétiques exige l'utilisation des marqueurs moléculaires à base d'ADN tels que : Restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) et simple sequence repeat (SSR, microsatellite) (Dolferus, 2014).

L'utilisation de nouvelles technologies comme les marqueurs DArT (diversity arrays Technology) (Jaccoud et al. 2001) et les marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism markers) (Dudley 1993; Mohan et al. 1997; Mammadov et al. 2012) ont permis la construction de cartes génétiques denses. L'identification des marqueurs SNP a été boostée par la disponibilité du séquençage génomique de plusieurs plantes cultivées. Par exemple 160 000 SNP ont été identifiés dans les fractions non répétitives de 20 différentes variétés de riz (McNally et al. 2009). Chez *M. truncatula* 1,8 million SNPs ont été identifiées alors que pour les SSR seulement près de 600 marqueurs ont été identifiés (Kang *et al.*, 2015).

Une carte génétique est élaborée par l'ordonnement de marqueurs grâce à l'analyse statistique de leur ségrégation au cours des générations. Elles permettent ainsi de situer dans l'ordre les positions relatives des marqueurs les uns par rapport aux autres. Les distances se mesurent en centiMorgans (cM) et la construction de la carte de liaisons génétiques s'appuie sur l'estimation du taux de recombinaison entre tous les locus pris deux à deux. Deux marqueurs sont d'autant plus difficilement séparables que leur taux de recombinaison tant vers le 0. Au delà de 50% de recombinaisons les marqueurs ne sont plus sur le même groupe de liaison (Chromosome).

L'objectif recherché en élaborant une carte génétique est que tout point du génome soit lié au moins à un marqueur (bonne répartition). Dans ce cas on dit que la carte génétique est saturée. Cette opération est indispensable pour assurer une recherche de QTL qui couvre l'ensemble du génome. Pour construire une carte saturée il faut augmenter le nombre de marqueurs, ce qui a pour conséquence de relier des groupes indépendants, jusqu'à ce qu'il y ait autant de groupes de liaison que de chromosomes, et plus aucun marqueur isolé (Santoni *et al.*, 2000). Lorsqu'une carte n'est pas saturée, on obtient en général de nombreux groupes de liaison de petite taille et des marqueurs isolés (De Vienne 1998). Dans le cas de *M. truncatula*, si les marqueurs sont bien réparties sur le génome, 50 marqueurs sont suffisants pour faire une analyse QTL (L. Gentzbittel, communication personnelle, 18 juin 2014).

Les principaux critères de l'élaboration d'une carte génétique sont :

- (i) développer une population de cartographie appropriée, souvent issue d'un croisement entre deux lignées pures (F2, lignées recombinantes, back-cross, ...). La taille de la population peut varier de 50 à plusieurs milliers d'individus (Mohan *et al.*, 1997) ;
- (ii) choisir un type de marqueurs moléculaires adéquat ;
- (iii) rechercher le polymorphisme chez les deux parents avec les marqueurs moléculaires choisis puis génotyper la population de cartographie avec les marqueurs polymorphes ;
- (iv) faire des analyses de liaisons qui se basent sur le calcul des fréquences de recombinaisons entre marqueurs, établir les groupes de liaison, estimer ensuite l'ordre et les distances des marqueurs sur la carte génétique.

3.2.4. Populations en ségrégation

Il existe plusieurs types de structures de populations qui sont utilisés pour la cartographie de liaison. On peut citer les lignées recombinantes consanguines (RILs), des lignées consanguines de rétrocroisement (BIL), des lignées de rétrocroisements avancés (ABL), et des lignées haploïdes doublées (DH).

Le croisement entre deux parents (lignées pures) contrastants produit des individus F1, tous identiques et hétérozygotes pour tous les locus ayant fixé des allèles différents (Fig. 5). Il faudra par conséquent, choisir autant que possible, des parents suffisamment éloignés génétiquement pour que le nombre de locus polymorphes ne soit pas limitant. Les meilleurs résultats devraient donc être en théorie obtenus dans des populations issues de croisements entre des lignées génétiquement distantes, pour lesquelles on maximise la probabilité d'observer de la variabilité

aux locus (Gallais and Rives, 1993). Mais, dans la pratique, le choix des génotypes de départ est le plus souvent fait sur la base de l'observation de la diversité phénotypique pour le (ou les) caractère(s) d'intérêt (s). Trois types principaux de populations de cartographie peuvent être dérivé d'un tel croisement : celles permettant l'accès à la phase haploïde, les populations F₂, et les populations de lignées recombinantes.

Les populations qui nous intéressent dans notre cas sont les populations de lignées recombinantes (RILs). Ces dernières sont obtenues par le croisement de deux parents homozygotes contrastés pour le caractère d'intérêt, suivie par des autofécondations successives à partir d'individus F₂ (Fig. 5). A chaque génération, un seul individu est choisi, qui sera à l'origine de la génération suivante par la méthode SSD (Single Seed Descent ou descendance monograine) pour atteindre des lignées homozygotes (Pace *et al.*, 2013).

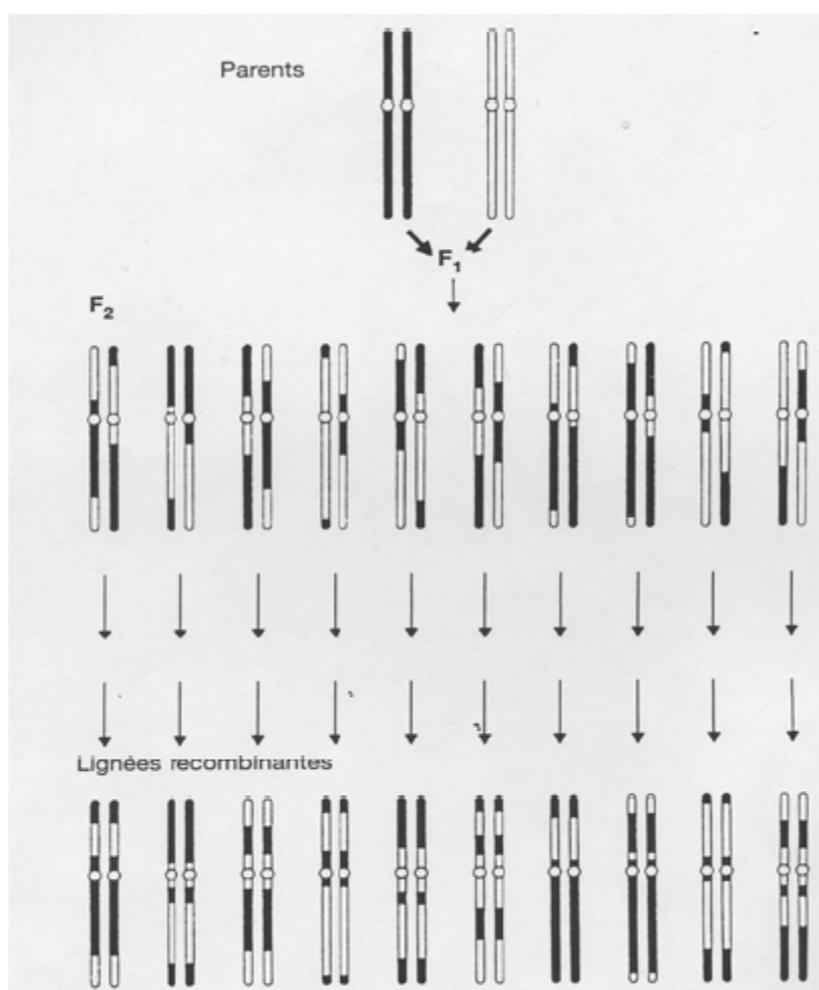


Fig. 5: Lignées recombinantes : Chaque paire de chromosomes schématise la structure du génome d'une plante. Les portions (noires ou blanches) représentent les contributions des lignées parentales (Burr and Burr, 1991)

Ce processus récurant a trois conséquences génétiques importantes (De Vienne, 1998):

- Comme à chaque génération d'autofécondation, chaque locus hétérozygote a une chance sur deux d'être fixé, l'hétérozygotie moyenne du génome décroît rapidement, au rythme de $1/2^n$, n étant le nombre de générations depuis la F_1 . En F_5 , 93.75 % du génome sont fixés (homozygote), 96.88 % en F_6 , 98.44 % en F_7 ;
- Les différents individus d'une famille issue d'un individu F_2 après n générations sont tous génétiquement identiques et présentent une hétérozygotie résiduelle correspondante à la génération $n-1$;
- Par méioses successives, plusieurs recombinaisons sont intervenues, et chaque famille issue d'un individu F_2 a fixé une combinaison allélique particulière à ses différents locus.

3.2.5. Phénotypage d'une population

Phénotyper une population consiste à attribuer à chacune des lignées recombinantes (RILs) la valeur mesurée d'un caractère étudié. Il y a beaucoup de caractères des êtres vivants qui varient de manière continue. Ils sont pour cette raison classés comme 'caractères quantitatifs' ou complexes et ont pour caractéristique d'être déterminés par un grand nombre de gènes, ce qui autorise l'existence d'interactions fortes entre ces gènes : soit entre des allèles du même locus (dominance) soit entre différents loci (épistasie) (Hill and Mackay, 2004)

3.3. Modèles et outils de recherche des QTL

L'objectif à travers la recherche de QTL est de déterminer les zones chromosomiques qui ont une influence sur l'expression des différents caractères quantitatifs étudiés. Le principe de détection des QTL se base sur la recherche systématique de déséquilibres de liaisons entre les locus marqueurs et locus contrôlant les caractères quantitatifs (De Vienne, 1998). Des marqueurs dont la ségrégation des allèles dans la descendance fait ressortir une liaison statistique significative avec la valeur phénotypique d'un caractère donné chez les individus.

3.3.1. Méthode de détection marqueur par marqueur

C'est une méthode qui a été formalisée par Soller *et al.* (1976). L'analyse est réalisée en modèle linéaire qui permet de rechercher par analyse de variance ou régression multiple, une relation entre le génotype de chaque locus marqueur et la valeur phénotypiques (observations) du caractère quantitatif considéré. En effet, pour chaque marqueur, il est possible de classer les individus selon l'allèle qu'ils portent (classes génotypiques) et calculer par la suite les moyennes pour chaque groupe. Les différences significatives, si elles existent, entre ces moyennes seront

déterminées suite à une analyse de variance. L'explication de l'effet du génotype au marqueur passe par la présence d'un QTL polymorphe génétiquement lié à ce marqueur. Cette approche est simple et robuste mais si la densité de marqueurs est faible, cette méthode est peu efficace pour l'estimation de la position et des effets des QTL, comme elle ne peut pas montrer si un marqueur est associé à un ou plusieurs QTL à la fois. En effet il est impossible de savoir si le QTL détecté à un marqueur est un QTL à fort effet, situé loin du marqueur ou bien un QTL à faible effet, situé près du marqueur. l'avantage majeur de cette technique réside dans l'utilisation du modèle linéaire qui permet une grande souplesse d'analyse notamment en donnant la possibilité d'incorporer le design expérimental et des covariables dans l'analyse (essais multiloaux, interaction marqueur x environnement..etc).

3.3.2. Méthodes de cartographie d'intervalle

La cartographie d'intervalle se base sur l'hypothèse qu'il y a un QTL au plus dans l'intervalle qui sépare deux marqueurs, liés avec un taux de recombinaison r . Les distances entre marqueurs sont connues et la position du QTL par rapport aux marqueurs est alors déterminée. Avec les méthodes par intervalle une densité de 1 marqueur tous les 10 cM est suffisante pour capturer les QTL à l'échelle du génome (Charmet 2011).

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

Cette méthode est utilisée généralement pour tester la présence d'un QTL dans un intervalle entre deux marqueurs :

- **Par le maximum de vraisemblance** : La méthode la plus utilisée est celle du calcul du LOD score (Logarithmics of the likelihood odds ratio) (Lander and Botstein, 1989). A chaque position du chromosome (à intervalle régulier de 2 cM, par exemple), on calcule le logarithme décimal du rapport de vraisemblance (présence d'un QTL/absence d'un QTL).

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

Par exemple, un LOD score de 2 signifie que la présence d'un QTL à un endroit donné du génome est 100 fois plus probable que l'absence de ce QTL. une courbe de Lod peut être tracée en fonction de la position sur le groupe de liaison. Le maximum de la courbe indique la position la plus probable du QTL, à condition qu'il dépasse un certain seuil (Fig. 6)

- **Par la régression multiple** : Cette méthode est semblable à la précédente, et équivalente en termes de puissance. Elle consiste à utiliser les testés et les estimations des modèles de régression linéaire (Haley and Knott, 1992). Elle présente en plus l'avantage d'être plus facile à généraliser pour d'autres types de populations expérimentales.

La principale limite de la cartographie d'intervalle est qu'elle ne permet pas de détecter avec précision des QTL proches sur le même chromosome, et agissant dans la même direction. Elle augmente par contre le risque de détecter un seul QTL fantôme entre les deux.

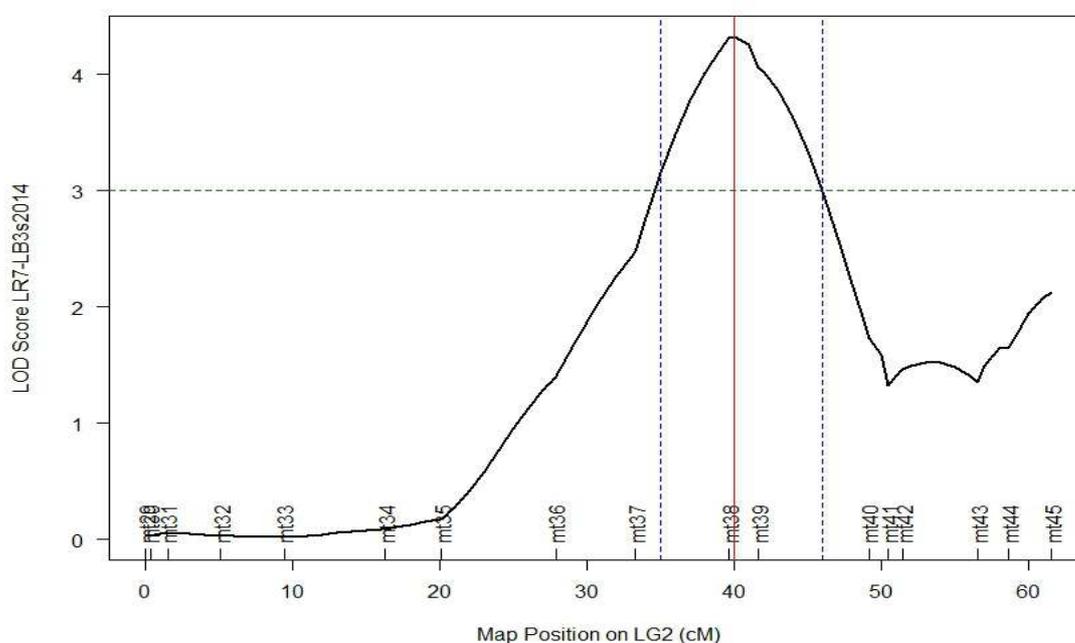


Fig.6 : Exemple de courbe de LOD obtenue pour la longueur du rameau dans le chromosome 2 de *M. truncatula*. En abscisse sont portés les marqueurs le long du chromosome, sur une échelle en centimorgans et en ordonnée la valeur du LOD. La ligne horizontale en pointillés représente le seuil de détection. Les deux lignes verticales représentent l'intervalle de confiance du QTL.

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

Cette méthode a comme principe de prendre les marqueurs génétiques flanquant des QTL présents dans le génome comme cofacteurs dans le modèle (Jansen and Stam, 1994). En pratique cela revient à prendre les autres QTL présents dans le génome, représentés par les marqueurs qui leurs sont proches, comme cofacteurs dans le modèle, ce qui réduit la part de la variation

résiduelle induite par leur ségrégation. L'objectif est de s'affranchir de ces marqueurs au QTL qui peuvent empêcher la détection de QTL proches à effet individuel trop faible, ou de signe opposés. Cette méthode est intéressante lorsque des QTL proches ont des effets individuels trop faibles, ou de signes opposés, mais n'est pas optimale pour la mise en évidence de QTL isolés (De Vienne 1998)

3.3.3. Paramètres estimés lors d'une recherche de QTL

3.3.3.1. L'intervalle de confiance du QTL (IC)

Il offre une zone centrée autour de la position à laquelle le QTL a été détecté le plus significativement. Lander and Botstein (1989) proposaient pour définir cet intervalle de construire cet IC en déterminant les points qui représentent une chute de 1 LOD de part et d'autre du sommet de LOD score (Fig.6).

3.3.3.2. L'effet additif du QTL

Il représente un effet génétique dû aux allèles d'un même locus. En d'autre terme c'est la différence d'effet sur la valeur du caractère des deux allèles parentaux en ségrégation (De Vienne, 1998). Cet effet est exprimé dans l'unité du caractère étudié; de plus il possède un sens (un signe + ou -), en référence à l'un des deux parents choisi arbitrairement, puisqu'il correspond à l'effet de la substitution d'un allèle parental par l'autre.

3.3.3.3. La part de variation phénotypique (R^2)

Elle représente le pourcentage de la variation phénotypique totale expliquée par le QTL. Généralement l'estimation de R^2 des QTL se fait à partir de la décomposition de la variance phénotypique totale sur les marqueurs les plus proches des QTL détectés (Charcosset and Gallais, 1996).

4. Effet de la sécheresse sur les plantes et les stratégies d'adaptation

4.1. Définition de la sécheresse

Les plantes sont immobiles et dépendent de leur environnement pour croître et pour se développer. Seulement cet environnement est très variable et constitue un défi permanent pour la plante. Ceci se manifeste surtout à travers les différents stress abiotiques que la plante subit tout au long de son cycle de vie : la lumière (qualité et intensité lumineuse), l'alimentation minérale (carences, toxicité, salinité), la température (fortes température, froid) et la disponibilité en eau (sécheresse, inondations) (Dolferus, 2014). Dans le monde, il a été estimé que seulement 10%

des terres arables peuvent être classées dans la catégorie des non-stressées, ce qui implique que les produits cultivés sur 90% des terres arables connaissent une ou plusieurs contraintes environnementales (Dita *et al.*, 2006).

L'eau est sans doute la constituante la plus importante pour les plantes, car elle représente plus de 90% du poids frais de la plupart des plantes herbacées (Wood, 2005). Une plante fourragère de bonne valeur alimentaire est non seulement constituée d'environ 70 à 85% d'eau mais elle doit renouveler plusieurs dizaines de fois le volume d'eau qu'elle contient chaque jour (Durand, 2007). Ainsi, les plantes consomment des centaines de litres d'eau pour faire un kilogramme de matière sèche végétale avec des variations importantes selon l'espèce (454 litres pour un maïs grain, 590 pour le blé tendre, 900 pour le soja, 1 600 pour le riz) (Pelletier, 2013).

Les précipitations, sources majeures en eau pour les plantes, sont rarement uniformes car l'ampleur des précipitations et leurs distributions, et donc la disponibilité de l'eau à des moments critiques du cycle de culture, sont devenues imprévisibles avec les changements climatiques récents (Feng *et al.*, 2013). En effet, les différents modèles climatiques montrent clairement que toutes les régions agricoles subiront la sécheresse (Seneviratne *et al.*, 2012). Certaines zones vont connaître une «saison sèche» prévisible tandis que d'autres régions vont connaître des périodes imprévisibles de sécheresse. Les régions agricoles touchées par la sécheresse peuvent avoir des pertes de rendement allant jusqu'à 50% ou plus (Wood, 2005).

En Agriculture le terme 'sécheresse' désigne une condition dans laquelle la totalité de l'eau disponible pour la plante, que se soit des précipitations ou par irrigation, est insuffisante pour faire face à la transpiration faite par la plante (Tuberosa, 2012). La disponibilité de l'eau représente de ce fait l'un des principaux obstacles à la productivité des plantes et constitue l'un des principaux facteurs de régulation de la distribution des espèces végétales (Boyer, 1982).

En outre, pour le stress hydrique, la sévérité, la durée et la période du stress, ainsi que les réponses des plantes après un stress, et l'interaction entre le stress et d'autres facteurs environnementaux sont extrêmement importants (Plaut, 2003).

4.2. Réponse des plantes à la sécheresse

La réponse des plantes à la sécheresse et leur tolérance à la dessiccation est l'un des plus intéressants phénomènes de la biologie (Wood, 2005). Elle représente l'un des concepts les plus ambiguës dans la littérature (Blum *et al.*, 2005 ; Tardieu, 2005) et sa définition est fortement dépendante des méthodes de phénotypage utilisées (Tuberosa and Salvi, 2006) ; cependant, la

production de cultures plus résistantes à la sécheresse représente l'un des défis majeurs du XXI^e siècle (Wood, 2005).

La tolérance à la sécheresse est un terme général appliqué à la fois aux plantes sauvages et aux plantes cultivées à travers des caractères d'adaptation qui leur permettent de faire face à un manque d'eau (Atwell *et al.*, 1999). Cependant, les plantes font face généralement à des épreuves qui souvent ne mettent pas immédiatement en péril la vie des plantes en danger, mais qui touchent la croissance et la productivité de celles-ci (Claeys and Inzé, 2013).

En situation de manque d'eau, les plantes doivent limiter les pertes d'eau dues à l'environnement. Pour y arriver elles ont développé un certain nombre de stratégies d'adaptation. Cependant, aucune catégorie de plantes n'emploie les mêmes stratégies d'adaptation (Wood, 2005). Au début les plantes, au niveau cellulaire, tentent de minimiser les effets néfastes du manque d'eau sur leurs métabolismes, mais avec le temps l'effet du stress devient visible sur le phénotype de la plante (Yordanov *et al.*, 2000). Les effets de la sécheresse vont de l'impact morphologique jusqu'aux niveaux moléculaires et sont palpables à tous les stades phénologiques de la croissance des plantes (Boyer, 1982).

Pour survivre et prospérer au sein des environnements limités en eau, les plantes doivent impérativement adapter leurs processus biochimiques et métaboliques, développer des mécanismes de protection pour limiter les dommages sur le protoplasme, instaurer des mécanismes capables de réparer les dommages induits par le stress, maintenir leur fécondité, et la liste peut être étendue (Wood, 2005).

Différentes définitions de la tolérance à la sécheresse ont été développées ces dernières décennies. Cependant, la définition originale qui est celle de Levitt (1980) reste valide et offre une approche rationnelle dans la classification des stratégies qui permettent aux plantes de contourner les effets négatifs de la sécheresse (Tuberosa, 2012).

Levitt (1972) a classé les différents mécanismes ou stratégies de résistance à la sécheresse en trois grandes catégories. La première consiste à 'échapper' à la sécheresse, la deuxième consiste à 'l'éviter' et la troisième consiste à la 'tolérer' :

4.2.1. L'esquive (évasion)

L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par un développement rapide permettant aux plantes de se reproduire avant que l'environnement ne

devient sec (Ludlow, 1989). Ainsi, la date de floraison est souvent le caractère principal qui est associé à l'échec dans les populations de plantes herbacées annuelles.

Une floraison précoce au cours d'une saison sèche est le résultat d'une grande fitness (valeur sélective), ce qui se manifeste par plus de graines ou par des graines de plus grande masse. La grande variation dans la date de floraison dans les populations naturelles a été bien documentée (Aronson *et al.*, 1992 ; Kelly and Levin 2000 ; Roux *et al.*, 2006 ; Franks *et al.*, 2007 ; Moreau *et al.*, 2007 ; Julier *et al.*, 2007 ; Pierre *et al.*, 2008 ; Cruz-Izquierdo *et al.*, 2012 ; Dittmar *et al.*, 2014). Dans ce contexte plusieurs études ont démontré que la précocité de la date de floraison est due à une évolution grâce à la sélection causée par la sécheresse (Franks *et al.*, 2007 ; Berger and Ludwig, 2014). La durée de la phase de floraison représente aussi un caractère majeur pour l'adaptation des plantes à leurs environnements, en particulier lorsque la période de croissance est limitée par une sécheresse précoce et des températures élevées (Farook *et al.*, 2009).

4.2.2. L'évitement

C'est la capacité de la plante à maintenir un état hydrique satisfaisant en augmentant son efficacité d'utilisation d'eau. La stratégie de l'évitement est principalement liée, d'une part, à la réduction de la transpiration et, d'autre part, à une optimisation de l'absorption d'eau par les racines (Poormohammad Kiani, 2007).

La diminution de la transpiration est principalement liée à la fermeture des stomates et à leurs caractéristiques (Durand, 2007). Elle est aussi influencée par les caractéristiques morpho-anatomiques des feuilles qui se manifestent par un port dressé de la plante ou l'enroulement des feuilles pour limiter l'énergie lumineuse incidente, la réduction de la taille des feuilles, une pubescence foliaire dense, une cuticule épaisse, des tissus fortement lignifiés, une couche de cire épicuticulaire, des cellules du mésophyle plus petites et moins d'espace entre les cellules, une réduction de la croissance de la plante, la sénescence ou la chute des feuilles dès qu'elles ont atteint l'âge adulte (Bacelar *et al.*, 2012 ; Pelletier, 2013). Il s'ensuit une chute de l'assimilation de CO₂ donc une baisse de production de biomasse (Poormohammad Kiani, 2007).

L'amélioration des capacités d'absorption de l'eau du sol par le système racinaire se mesure à travers des caractères comme le taux de croissance, le volume, la profondeur et le poids sec des racines (Hossain *et al.*, 2016). De manière générale, les racines chez la plupart des plantes cultivées sont moins sensibles au stress hydrique que les organes aérien. C'est ainsi que, même si en conditions sèches les racines poussent moins (en longueur), elles accumulent par contre une

proportion plus grande de matière sèche que les parties aériennes au volume plus réduit (Durand, 2007).

4.2.3. La tolérance

Une fois le stress hydrique établi, la plante n'a plus le choix et doit faire face en essayant de retarder, voire de supporter la déshydratation de leurs tissus (Bacelar *et al.*, 2012). Les plantes vont essayer de tolérer le stress (situations optimales d'approvisionnement en eau) tout en gardant leur capacité à croître, à fleurir et à donner un rendement économique (Boyer, 1996).

Les plantes tolérantes à la sécheresse ont développé certains mécanismes adaptatifs pour afficher différents degrés de tolérance, qui sont en grande partie déterminés par la plasticité génétique (Volis *et al.*, 2015). Les Différences de tolérance au stress qui existent entre les plantes pourraient être attribuées à des différences de réactivité des plantes par rapport à la manière de perception du stress (Zhu, 2001).

Les plantes tolérantes à la sécheresse sont capables de résister à la déshydratation et compenser la chute de turgescence par l'ajustement osmotique (Chen and Jiang, 2010). Ce dernier se manifeste en chargeant les solutions tissulaires en différentes substances dissoutes (sels, sucres, acides,...). La cellule se met aussi à produire des molécules qui permettent de stabiliser les protéines (Ludlow, 1989). En effet, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous stress hydrique peut causer des dommages oxydatifs aux lipides, à l'acide nucléique de la cellule et à certains protéines (Baier *et al.*, 2005). Les plantes répondent à l'augmentation des ROS en produisant des antioxydants non enzymatiques ou par la défense enzymatique (les enzymes antioxydantes) pour prévenir ou réduire les dommages oxydatifs du ROS sous stress hydrique (Tuteja and Gill, 2013).

4.3. Méthodes d'étude et d'application du déficit hydrique

Après des décennies de recherche sur la façon dont les plantes réagissent et s'adaptent à la sécheresse, de nombreuses pistes intéressantes ont été identifiées, mais peu de ces connaissances ont été traduites sur le terrain (Deikman *et al.*, 2012). L'une des raisons qui a été présentée, pour expliquer ce constat, vient du fait que souvent les essais qui sont utilisés sont artificiels et trop sévères (Lawlor, 2013). Par conséquent, la sévérité, la durée et la période pendant laquelle le stress se produit doivent être soigneusement contrôlées (Claeys and Inzé, 2013). D'autre part, les valeurs d'héritabilité calculées dans les études de laboratoire surestiment les héritabilités mesurées sur le terrain et pourraient donc biaiser la capacité des espèces à répondre à la sélection (Geber and Griffen, 2003).

En effet, la plupart de nos connaissances sur les effets du manque d'eau sur les plantes proviennent des premières études qui se basaient sur l'exposition des plantes à une déshydratation sévère, obtenus, par exemple, en coupant les feuilles et de les laisser sécher sur le banc ou en retenant l'eau aux plantes pendant des semaines jusqu'à ce qu'ils montrent un flétrissement sévère (Claeys and Inzé, 2013). En parallèle, d'autres études, provoquant un choc osmotique, ont été utilisées. Elles ont été réalisées en transférant des plantes dans des solutions déshydratantes contenant des concentrations élevées (plus de 100 mM) de mannitol ou de polyéthylène glycol (PEG) (Claeys and Inzé, 2013).

L'utilisation d'un milieu artificiel offre quelques avantages comme un contrôle très pointu de la sévérité du stress appliqué, une faible variabilité qui est dû habituellement à l'environnement et surtout la possibilité de faire croître plusieurs plantes dans un espace réduit (Verslues *et al.*, 2006). Mais bien que ces types d'expériences aient considérablement augmenté notre connaissance de la physiologie du stress et des réponses moléculaires, ils peuvent ne pas refléter les conditions physiologiques qui peuvent se produire dans la nature (Lawlor, 2013).

D'autres complications proviennent du fait que, dans le champ, différentes contraintes sont souvent vécues simultanément, et un rapport récent suggère que les réponses à des combinaisons de contraintes ne peuvent pas facilement être prédites à partir des réponses de stress simples (Rasmussen *et al.*, 2013). En réalité, les plantes doivent répondre simultanément à plusieurs contraintes, par exemple la sécheresse, la lumière excessive et à la chaleur. Ces types de contraintes ne sont généralement pas prévisible à partir des études faites sur des facteurs individuels (Zhou *et al.*, 2007). En effet, le transcriptome et le métabolome qui se forment dans une situation de forte chaleur combinée à une grave sécheresse, deux contraintes qui se produisent souvent ensemble dans des conditions agricoles, ont été précédemment jugées très différentes des réponses à un stress unique (Rizhsky *et al.*, 2004).

En général, une distinction claire doit être faite aussi entre les caractères qui aident les plantes à survivre face à un stress sévère et les stressés qui provoquent des pertes de rendement dans les cultures exposés à des stress hydriques modérés ou moyens (Tuberosa, 2012). En effet il a été prouvé que les gènes qui confèrent une tolérance au stress sévère ne peuvent pas améliorer la croissance dans des conditions plus douces de stress (Skirycz *et al.*, 2011).

4.4. Phénotypage sur le terrain ou sur un milieu contrôlé ?

Pour répondre à la question, qu'elle condition de phénotypage (sur champs ou en milieu contrôlé) est plus adaptée pour étudier les effets du stress hydrique ? La réponse est que ceci dépend de plusieurs facteurs.

En effet, les milieux contrôlés permettent de maîtriser la période, la fréquence, la durée et la sévérité du stress qu'on veut appliquer aux plantes. Ils permettent aussi de voir l'effet de chaque stress séparément. Ceci représente un avantage considérable par rapport aux essais faits sur champs ou les conditions environnementales sont très variables et totalement imprévisibles (Dolferus, 2014).

Cependant, les conditions environnementales que vivent les plantes dans un milieu naturel restent très difficiles à reproduire dans un milieu contrôlé, même avec l'aide des avancés spectaculaires de la technologie (Cortés *et al.*, 2012). L'humidité de l'air, la variation de la quantité et de la qualité de la lumière tout au long de la journée, contrôlent d'importants processus physiologiques, jusqu'à présent ignorés dans les milieux artificiels (Dolferus, 2014).

Au champ, les changements environnementaux qui peuvent stresser la plante se produisent le plus souvent durant plusieurs heures durant la journée (stress dû à la chaleur) ou bien pendant plusieurs jours (stress dû au manque d'eau). Ce changement graduel est très difficile de reproduire dans un milieu contrôlé, et le stress est souvent imposé d'une manière brusque, causant un choc pour la plante en l'empêchant de s'adapter graduellement au stress (Dolferus, 2014).

Cependant, les milieux contrôlés représentent dans certaines situations le meilleur moyen de comparer la réponse des plantes aux différents stress séparément. Ils permettent aussi de comparer les différences de réponse de la plante au stress hydrique durant les différentes phases de développement et l'effet de la durée du stress et de sa sévérité sur les différents paramètres étudiés (Dolferus, 2014). Les milieux contrôlés sont indispensables pour comparer plusieurs lignées avec différentes dates de floraison et auxquelles on voudrait appliquer un stress hydrique au même stade de développement (Dolferus, 2014).

La façon particulière dont le stress hydrique est imposé pourrait être d'une importance particulière dans la compréhension de la réponse sur le terrain à la sécheresse, ainsi que dans l'évaluation de la capacité de la plante à s'acclimater au stress hydrique (Kaiser, 1987). De ce fait plusieurs précautions doivent être prises en considération :

- Pour les expériences à court terme, suspendre l'irrigation est la méthode la plus courante pour provoquer un stress hydrique, par contre pour avoir une réponse plus proche de la réalité du terrain, un stress hydrique cyclique est nécessaire (Pennypacker *et al.*, 1990) ;
- L'utilisation des pots avec un substrat solide constitue une alternative aux essais en plein champs, puisque il permet un meilleur contrôle des nutriments et de l'humidité du sol en comparaison avec le terrain et permet aussi d'imiter les conditions de résistance du sol à la croissance des racines (Poorter *et al.*, 2012). Cependant, il faut faire attention à ne pas utiliser des pots très petits qui limiteraient la croissance racinaire des plantes et influenceraient sur la sévérité et la vitesse d'induction du stress hydrique désiré (Passioura 2006). En effet cela conduit à une forte demande d'évaporation, et un épuisement très rapide de l'eau disponible, ce qui laisse peu de temps à la plante pour s'acclimater physiologiquement et morphologiquement (Poorter *et al.*, 2012) .
- D'un autre coté si les plantes sont trop petites au début de la sécheresse par rapport à la quantité de l'eau du sol disponible et placées dans des conditions de faible demande évaporative, cette méthode peut ne pas fonctionner, tout simplement parce que les plantes ne draineront pas assez l'eau disponible pour provoquer la sécheresse.
- Il est préférable aussi de mettre dans chaque pot une masse fixe de sol plutôt qu'un volume fixe. Ceci s'explique par le fait que la densité du sol peut varier, en particulier pour la tourbe et se répercute sur la quantité d'eau disponible (Poorter *et al.*, 2012) ;
- Un autre aspect important est le nombre de plantes qui seront allouées à chaque traitement. Dans des expériences dans lesquelles une population de cartographie est utilisée pour détecter les locus quantitatifs (QTL), la règle est qu'il est préférable de réduire au minimum le nombre de répétitions et de maximiser le nombre de génotypes. Cela donnera de meilleures estimations de QTL (Zou *et al.*, 2006) ;
- Les expériences qui visent à évaluer l'effet de la sécheresse sur la croissance des plantes devraient induire un stress hydrique lentement, pour permettre à la plante la possibilité d'exprimer des stratégies d'acclimatation inhérentes telles que l'ajustement osmotique (Ludlow, 1987) ;
- La croissance des pousses peut être utilisé comme un indicateur sensible de la tolérance au stress, tandis que la croissance des racines, qui est la plus communément mesurée, est moins sensible au stress abiotique (Verslues *et al.*, 2006).

5. Les nouvelles méthodes de sélection des plantes vis-à-vis de la sécheresse

La sélection traditionnelle a permis pendant plusieurs décennies de faire face au challenge de la sécurité alimentaire dans le monde. La révolution verte, qui a commencé en 1940 suite aux recherches du Dr. Norman Borlaug sur le blé, a permis quelques années plus tard de tripler les rendements au Mexique de cette céréale. Le transfert de ce blé à haut rendement (Lerma Rojo64, Sonora 64), dans plusieurs pays de l'Asie du sud comme le Pakistan et l'Inde dans les années 1960, a permis de doubler leur production et de sauver des millions de vies de la famine. Mais depuis, la sélection de variétés résistantes aux insectes et aux maladies a été la plus importante qui, certes, a eu des répercussions directes sur le rendement, mais en contre partie peu de recherches ont été faites sur la tolérance à la sécheresse (Ashraf, 2010).

Au cours des 10 dernières années, l'application des nouvelles techniques et connaissances en génomique a ouvert des opportunités sans précédent. Comparée aux différentes techniques conventionnelles de sélection, la génomique permet de disséquer les caractères quantitatifs en leurs déterminants génétiques les plus simples QTL (Quantitative Trait Loci) (Ribaut *et al.*, 2002), ouvrant ainsi la voie à la sélection assistée par marqueurs (MAS), pour aboutir finalement au clonage de QTL et de leur manipulation directe par le génie génétique (Salvi and Tuberosa, 2005) ou la transgénèse (Ashraf, 2010).

L'application de l'analyse QTL a fourni des opportunités sans précédent pour identifier les régions chromosomiques contrôlant les variations existantes concernant les changements physiologiques, morphologiques et de développement observés au cours de la croissance des plantes dans des conditions de stress hydrique limitant (Cattivelli *et al.*, 2008)

L'analyse de la physiologie des plantes a permis l'identification des caractères capables de conférer une résistance aux stress abiotiques. Certains de ces caractères sont sensiblement variables : les caractéristiques des racines, l'utilisation efficace de l'eau, l'efficacité de la transpiration, les hydrates de carbone solubles dans l'eau, etc (Latha *et al.*, 2004). Une fois les caractères utiles ont été identifiés, différentes approches peuvent être utilisées pour identifier les déterminants génétiques de ces caractères. Néanmoins, de nouvelles stratégies pour améliorer les plantes cultivées d'une manière plus rapide et plus efficace ont été mises en application. Au cours des dernières décennies, des études génétiques ont produit plusieurs nouveaux outils pour la sélection (Callow *et al.*, 1997), comme la technique du « Genome-Wide Association Study » (GWAS) (Zhou *et al.*, 2010 ; Wehner *et al.*, 2015) ou bien de la « Génomique sélection » (GS) (Beyene *et al.*, 2015).

5.1. Avantages et limites d'utilisation des QTL de résistance à la sécheresse dans la sélection

La tolérance au stress hydrique est contrôlé par une multitudes de gènes à faibles effets (polygènes) qui ont un effet additif dans leur expression (Ashraf, 2010). Les QTL peuvent être classés en fonction de la stabilité de leurs effets sous différentes conditions environnementales. Un QTL constitutif est toujours détecté dans la plupart des environnements, alors qu'un QTL adaptatif est détecté uniquement dans des conditions environnementales spécifiques ou bien il peut montrer un accroissement de son expression avec l'augmentation du niveau du facteur environnemental (Collins *et al.*, 2008). Comme par exemple, un QTL qui est exprimé plus fortement avec l'accroissement de la température (Vargas *et al.*, 2006).

La cartographie des QTL de caractères de résistance au stress hydrique (manque d'eau) a été faite sur différentes cultures. Les plus importantes sont le blé (Valkoun, 2001), le maïs (Prasanna, 2012), l'orge (Verhoeven *et al.*, 2004) et le riz (Sakai and Itoh, 2010 ; Menguer *et al.*, 2017). Chez les légumineuses Le nombre croissant de recherches impliquant l'identification de QTL de résistance à la sécheresse montre clairement l'engouement pour cette approche (Cattivelli *et al.*, 2008). En effet, plusieurs recherches ont été faites notamment sur le pois chiche (Hamwiah *et al.* 2013; Varshney *et al.* 2014), le haricot (Miklas *et al.* 2006), la lentille (Idrissi *et al.* 2016; Singh *et al.* 2016). Pour le soja par exemple une population recombinante a été développée à partir d'un croisement entre deux lignées parentales de soja contrastées: Kefeng1, tolérante à la sécheresse et Nannong1138-2, sensible à la sécheresse (Du *et al.*, 2009). Cette population de RILs a été utilisé pour évaluer plusieurs caractères en relation avec la résistance à la sécheresse et le rendement en graine dans des conditions de stress hydrique et en irrigué. Au total, 40 QTL ont été identifiés: 17 concernent des caractères en relation avec l'état de l'eau dans la feuille en condition de stress hydrique et 23 pour le rendement en graines dans des conditions de sécheresse ou bien irrigué.

Mais bien que la cartographie des QTL de caractères de résistance au stress hydrique a donné énormément de résultats, leur concrétisation sur le terrain reste cependant mitigés. Néanmoins, les quelques cultivars qui ont été développés en utilisant cette technique ont donné de très bons résultats en subissant une contrainte hydrique au champs (Ashraf, 2010). Par exemple, Steele *et al.* (2006) ont réussi par série de rétrocroisements assistés par marqueur à améliorer certaines caractéristiques morphologiques fondamentales des racines (la longueur et l'épaisseur des racines) d'une variété élite de riz d'origine indienne (Kalinga III). Le Cultivar Azucena, une variété originaire des Philippines était le parent donneur. Les auteurs ont ciblé quatre QTL

contenus sur différents chromosomes pour l'introgression. Les résultats obtenus ont permis d'avoir une meilleure tolérance à la sécheresse, d'améliorer les rendements ainsi que la précocité de maturation et la qualité des graines. Chez l'orge (*Hordeum vulgare*) 81 QTL ont été utilisés sur des populations issues d'un rétrocroisement avec un parent sauvage (*Hordeum spontaneum*) et qui ont permis d'améliorer le rendement et d'atténuer l'impact négatif du stress hydrique sur le remplissage des grains (Baum et al. 2003)

Dans la pratique des centaines de QTL ont été identifiés, mais malheureusement juste quelques uns seulement peuvent être détectés dans différents environnements et juste quelques uns aussi ont été vérifiés ou clonés et testés au champ dans un programme de sélection visant à améliorer la tolérance à la sécheresse (Hu and Xiong, 2014).

Il existe plusieurs facteurs qui rendent l'utilisation de QTL dans l'amélioration génétique difficile. Le problème majeur auquel les scientifiques ont dû faire face est la précision d'identification des QTL. D'autres problèmes sont dus à la très imposante interaction Génétique x Environnement, à la difficulté de répéter les mêmes résultats obtenus dans des expériences précédentes et au nombre très importants de gènes qui contrôlent le rendement (Ashraf, 2010). De même, en raison d'une interaction épistatique défavorable, il est très difficile de faire exprimer l'allèle désiré dans un fond génétique différent (variété élite) (Podlich *et al.*, 2004 ; Collins *et al.*, 2008).

Les principaux QTL pour des caractères tels que le temps de la floraison, la tolérance à une salinité élevée, la submersion, ou le gel (froid), ont été déterminés rapidement, et l'utilisation de la cartographie fine des gènes candidats ont également été identifiés. Cependant, pour des caractères plus complexes tels que la résistance à la sécheresse et au stress thermique, certains QTL identifiés dans une étude ne peuvent pas être détectés dans d'autres études qui utilisent des populations de cartographie différentes ou des conditions de stress différentes. Pour surmonter ce problème, l'analyse méta-QTL a été utilisée pour identifier les QTL de consensus entre les différentes populations et environnements (Dwiyanti and Yamada, 2013).

5.2. L'exploitation des espèces sauvages apparentées dans la détermination de QTL pour la sélection

Lorsque la variation génétique disponible est insuffisante pour parvenir à des améliorations significatives de la résistance à la sécheresse à l'intérieur d'une espèce, de plus en plus de nouvelles variantes alléliques sont recherchées à partir des espèces sauvages adaptées à des environnements secs (Abberton *et al.*, 2016). Les résultats obtenus montrent que sur 81 QTL qui

affectent des caractères agronomiques, 43 allèles bénéfiques appartiennent au parent sauvage. Concernant le rendement la plupart des allèles responsables de l'amélioration du rendement ont comme origine un parent sauvage (Talamé *et al.*, 2004). Mais dans la pratique seule une poignée d'exemples de parents sauvages contribuant à la résistance génétique aux stress abiotiques chez les cultures ont atteint le stade cultivars bien que de nombreux parents sauvages ayant un potentiel aient été décrits (Hajjar and Hodgkin 2007).

Des allèles QTL bénéfiques ont été trouvés dans certains parents sauvages. En effet, La comparaison entre les séquences du génome du riz sauvage (*Oryza rufipogon*) et celui du riz cultivé (*O. sativa japonica*) a révélé un nombre significatif de gènes perdus par l'espèce cultivée (Sakai and Itoh, 2010). Les allèles QTL peuvent être identifiés au moyen de techniques tel que advanced back-cross QTL analysis (AB-QTL), une approche basée sur l'évaluation des familles de rétrocroisements dérivées d'un croisement entre une variété élite, utilisée comme parent récurrent et les accessions donatrices d'espèces sauvages qui doivent être sexuellement compatibles (Tanksley and Nelson, 1996).

Les légumineuses alimentaires, en comparaison avec les cultures céréalières, n'ont pas reçu la même attention en ce qui concerne l'utilisation de leurs parents sauvages pour la sélection de nouveaux cultivars et l'amélioration de leurs résistance aux stress environnementaux (Gentzbittel *et al.*, 2015).

Chez le pois chiche par exemple l'absence de variabilité génétique chez les variétés cultivées à nécessité la collecte et l'évaluation des espèces sauvages pour les utiliser dans les programmes d'amélioration (Singh *et al.* 2008). Des QTL pour la couleur des fleurs, l'épaisseur et le poids des graines ont été trouvés en utilisant les cartographies de populations issues de croisement interspécifique et intraspécifiques, mais aucun de ces QTL n'a montré de lien très étroit avec les marqueurs nécessaires pour faire une MAS (sélection assistée par marqueur) (Singh *et al.* 2008).

Le degré élevé de sythénie entre la plante modèle *M. truncatula* et certaines légumineuses cultivées peut être exploité pour améliorer les cartes génétiques et identifier les gènes candidats pour les caractères agronomiques dans les cultures moins bien caractérisées (Gentzbittel *et al.*, 2015). Comme cela a été décrit pour la forme des feuilles chez *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vaughn *et al.*, 2014), des caractères d'adaptation à la sécheresse chez *Vicia faba* (Khazaei *et al.*, 2014) ou des gènes symbiotiques chez le pois (Novak *et al.*, 2015), ou encore le gène RCT1 de *M. truncatula* qui procure une résistance à l'antracnose chez la luzerne (Yang *et al.*, 2008).

Chapitre II

Variabilité génétique et effet du stress hydrique sur des caractères de fitness chez quelques génotypes de *M. truncatula*

Chapitre II : Variabilité génétique et effet du stress hydrique sur des caractères de fitness chez quelques lignées de *M. truncatula*.

1. Introduction

la sécheresse est l'un des stress abiotiques les plus importants qui touche autant les plantes naturelles que celles cultivées (Juenger, 2013). Mais de toutes les contraintes abiotiques qui réduisent la productivité des cultures, la sécheresse est la plus dévastatrice et la plus récalcitrante aux efforts des sélectionneurs (Tuberosa and Salvi, 2006).

En effet, le déficit hydrique est un stress environnemental habituel rencontré par les plantes. Cela affecte à la fois le développement et la croissance de la plante, et a un effet négatif sur sa productivité (Verslues *et al.*, 2006 ; Tuberosa and Salvi, 2006). Le stress hydrique est qualifié généralement de stress multidimensionnel, car il affecte les plantes à différents niveaux de leur organisation, c'est-à-dire aux niveaux morphologiques, phénologiques et de production (Anjum *et al.*, 2011).

La tolérance des plantes à la sécheresse est un terme général appliqué à la fois aux plantes sauvages et cultivées pour décrire les caractères adaptatifs qui leur permettent de faire face à un manque d'eau (Atwell *et al.* 1999). Mais alors que chez les espèces agricoles ce phénomène est étroitement lié à la productivité (maximisation de la biomasse et/ou de la quantité de grain) chez les végétations naturelles, elle représente une évolution destinée à assurer le succès de la reproduction ou « fitness » (Bodner *et al.*, 2015).

Le terme «fitness» a été largement utilisé par les biologistes et bien qu'ils aient offert un nombre important de définitions, ils sont largement d'accord sur l'essence de l'idée. Le terme fitness est défini comme la capacité d'un organisme (des populations ou des espèces) à survivre et à se reproduire dans l'environnement dans lequel ils se trouvent et à produire une future descendance (Orr 2010).

L'étude des mécanismes biologiques utilisés par les légumineuses, en réponse à des conditions de stress abiotiques, a été facilitée par la mise en place de plusieurs espèces modèles. *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* ainsi que la plante cultivée *Glycine max* (soja) (Araújo *et al.*, 2015 ; Gentzbittel *et al.*, 2015). En effet, les légumineuses modèles ont fourni une ressource précieuse servant à disséquer les réponses physiologiques et moléculaires aux stress abiotiques (Araújo *et al.*, 2015).

Concernant *M. truncatula* et si on prend la biomasse végétale comme indicateur de la tolérance à la sécheresse, c'est une espèce assez tolérante à la sécheresse par rapport à d'autres légumineuses comme le pois (González *et al.*, 1998) ou le soja (González *et al.*, 1995). La tolérance au stress hydrique peut-être différente selon les cultivars ou écotypes étudiés de la même espèce (González *et al.*, 2007).

Dans une autre étude, Nunes *et al.* (2008) ont évalué les mécanismes d'évitement et de tolérance à la sécheresse développés par *M. truncatula* cv. Jemalong. Les plantes ont été testées dans des conditions de stress moyen, lorsque la teneur en eau du sol a diminué de moitié par rapport à son maximum. Les résultats obtenus ont révélé que les plantes stressées de *M. truncatula* ont préservé leur teneur relative en eau des feuilles (RWC) et leur taux net de fixation du CO₂ de départ ainsi que leurs habituels procédés photochimiques et biochimiques intervenant dans la photosynthèse, suggérant que les plantes ont la possibilité d'éviter la déshydratation des feuilles (González *et al.*, 2007).

D'un autre côté, le stress dû à la sécheresse peut être appliqué de diverses manières, toutes avec des résultats différents. L'approche suivie dépend fortement du type de questions que l'on veut aborder (Poorter *et al.* 2012). Souvent, le stress hydrique est considéré comme une condition binaire, comparant un traitement de stress arbitraire avec un contrôle et on a généralement tendance à sous estimer la grande variété des niveaux de stress (Claeys and Inzé, 2013).

En effet, alors que l'étude des réponses au stress chez les plantes a jusqu'ici porté principalement sur les stress sévères et aiguës (Boyer, 1982), dans les conditions naturelles et sur le terrain, les plantes éprouvent souvent une grande variété de niveaux de stress, ce qui nécessite une série de mécanismes de réponses différentes. Par exemple, la sécheresse qui menace la vie de la plante est très différente d'un déficit hydrique transitoire et ils provoquent, tous les deux, des réponses différentes (Claeys and Inzé, 2013).

D'autres complications dans l'estimation des effets du déficit hydrique résultent, dans la grande variabilité des réponses, aux manque d'eau en fonction des stades de développement des plantes (Vinocur and Altman, 2005). En effet, un stress hydrique appliqué en début de croissance n'aura pas les mêmes répercussions qu'un stress hydrique de fin de saison sur le comportement de la plante.

L'originalité de ce travail réside dans le fait qu'on a appliqué un stress hydrique cyclique qui consiste à priver la plante d'eau jusqu'à atteindre un taux de tarissement de 80% de la réserve utile (RU) et à l'irriguer, par la suite, pour que la plante puisse retourner aux conditions initiales.

Cette opération est répétée plusieurs fois avec comme objectif de mimer ce qui se passe dans la nature où la plante subit une période de précipitations suivie de périodes de sécheresse et ainsi de suite.

En effet, les cycles de dessèchement et de réhydratation sont des processus qui se manifestent dans des conditions naturelles au cours des différentes saisons, et dans les pratiques agricoles telles que l'irrigation et le lessivage du sol (Vinocur and Altman, 2005). L'intérêt de la répétition du manque d'eau est de donner à la plante le temps de déclencher ses mécanismes d'adaptation ou de résistance à la situation de sécheresse qu'elle subit (Ludlow 1989). Afin d'atteindre cet objectif, nous avons réhydraté les plantes de manière à ce que l'état de l'eau du sol soit contrôlée individuellement pour chaque pot. Ceci implique que la quantité d'eau fournie remplacera celle absorbée par les plantes, en gardant un état d'eau constant et égal dans le sol.

L'objectif recherché à travers ce premier chapitre est de faire une caractérisation des différentes lignées de *Medicago truncatula* et de mettre en évidence la diversité de comportement de cette espèce, que ce soit en condition irriguée ou bien en condition de stress hydrique.

En effet, la caractérisation de ces lignées en réponse au stress hydrique à travers différents caractères de fitness a pour objectif de choisir les parents les plus contrastants. Ces derniers et à travers une population de lignées recombinantes (RILs), d'une carte génétique et des résultats du phénotypage permettront de passer à l'étape suivante, qui est celle du déterminisme génétique (recherche QTL) des différents caractères étudiés (Chapitre III).

2. Matériels et méthodes

2.1. Conduite de la culture

L'essai a été réalisé dans la station expérimentale Mehdi Boualem de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRAA), Alger. Le semis a été effectué le 18 janvier 2011 dans une serre couverte en plastique polyéthylène et ouverte des deux cotés. Le but étant d'abriter l'essai des pluies.

Les graines de *M. truncatula* ont été semées directement après scarification dans des pots individuels de 5 L. Trois graines ont été semées dans chaque pot. Après développement des plantes, un démariage au stade première branche B0 (Moreau *et al.*, 2006) a été effectué, laissant une seule plante par pot.

Le substrat utilisé est composé d'un tiers de sol (argilo-sableux) appartenant à la station, un tiers de tourbe et un tiers de sable de rivière. Le sol et le sable ont été tamisés à 5 mm.

2.2. Méthode d'application du stress hydrique

Les plantes ont été conduites en irrigué jusqu'à l'apparition de la première fleur, où un premier stress hydrique a été effectué en prenant en considération la floraison de chaque plante individuellement. Pour rendre cette méthode applicable, les plantes ayant fleuri à la même date ont été balisées par une même couleur afin de les distinguer des autres groupes de plantes qui se succèdent et auxquels on attribue des couleurs différentes.

Le dessèchement du sol doit correspondre à un taux de tarissement de 80% de la réserve utile (RU) ; une fois atteint, le sol est réhydraté jusqu'à sa capacité de rétention (Cr). Trois cycles de stress successifs ont été appliqués pour chaque plante. A la fin du troisième cycle de stress le sol est remis à sa capacité de rétention maximale et conduit en régime hydrique optimum (ETM) jusqu'à la sénescence totale des plantes.

2.3. Détermination du taux de tarissement de l'eau du sol

Afin de contrôler le dessèchement graduel du sol, des pesées ont été réalisées pour chaque pot tous les deux jours. Le stress est maintenu jusqu'à atteindre un poids final (PF) qui a été déterminé auparavant, et qui correspond dans notre cas à un taux de tarissement de 80% de la réserve utile (RU). Le poids final de chaque pot est déterminé en fonction du poids initial (Pi) du pot à la capacité de rétention (Mouhouche *et al.*, 1998). Le calcul de l'humidité du sol à la capacité au champ se fait par la formule suivante (Annexe 01) :

$$\text{L'humidité du sol } H \% = \frac{P(\text{poids humide}) - P'(\text{poids sec})}{P'(\text{poids sec})}$$

Le stress est arrêté lorsque le poids du pot a atteint le poids final tel que :

$$P_f = P_i - 0.8 \text{ RU}$$

P_f : Poids final du pot à la fin du stress (g)

P_i : Poids initial du pot à la capacité de rétention, au début du stress (g)

RU : Réserve utile du sol (en g/g de sol sec)

Sachant que :

$$P_i = P_s + C_r$$

P_s : Poids du sol sec du pot

C_r : Poids de l'eau du pot à la capacité de rétention (g)

$$P_i = P_s + 0.309 P_s = 1.309 P_s$$

$$P_s = P_i / 1.309$$

La fraction de la réserve utile du sol est définie à partir de sa composition granulométrique. Notre sol étant de texture argilo-sableuse auquel on a rajouté du sable et de la tourbe, la réserve utile représente 50% de l'eau total retenue à la capacité de rétention (Smith, 1992)

$$RU = 0.50 * 0.309 Ps = 0.1545 Ps$$

$$RU = 0.1545 * Pi / 1.309 = 0.1180 Pi$$

$$PF = Pi - 0.8 Ru = Pi - 0.8 * 0.118$$

$$PF = Pi - 0.0944 Pi = Pi (1-0.0944)$$

$$PF = 0.9056 Pi$$

Le stress est arrêté lorsque chaque pot à perdu 9.44 % de son Pi à la capacité de rétention (CR).

2.4. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de 10 lignées d'origines méditerranéennes diverses (Tab. 2). À l'exception d'ALG423-406, les autres lignées (A10, Jemalong-A17, DZA315.16, F83005.5, F83005.9, TN1.11, TN1.21, TN6.18, et TN8.3) appartiennent à une collection de lignées qui sont utilisées dans le séquençage du génome de *M. truncatula* (<http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/mauguio/mauguio.php?page=menu21&menu=barmenu2&numero=2>).

Plusieurs cartes génétiques ainsi que des populations de RILs sont issues du croisement entre certaines de ces lignées alors que d'autres sont en progression [LR1 : DZA315.26 x DZA45.6 (Pierre *et al.*, 2008), LR3 : DZA45.5 x F83005.5 (Avia *et al.*, 2013b), LR4 : Jemalong-6 x DZA315.16 (Julier *et al.*, 2007 ; Ben *et al.*, 2013) LR5 : A17 x F83005.5 (Arraouadi *et al.*, 2010, 2012 ; Badri *et al.*, 2011 ; Ben *et al.*, 2013), LR6 : A17 x A20 (Lagunes Espinoza *et al.*, 2012), LR7 : TN1.11 x A17 (Foroozanfar *et al.*, 2014)] (Fig. 7).

Les lignées utilisées dans cet essai ont été fourni par le Pr. Huguet Thierry (INRA-CNRS Toulouse) et le Pr. Gentzbittel Laurent du Laboratoire EcoLab, Université de Toulouse. La lignée ALG423-406 est d'origine algérienne obtenue par Dr. Laouar Meriem (INRAA/ENSA Alger) et Abdelguerfi Aïssa (ENSA Alger).

Tab. 2 : Origines des lignées de *M. truncatula* étudiées

Lignée	Origine	Lignée	Origine
TN1.11	Tunisie	F83005.5	France
TN6.18	Tunisie	A17	Inconnue
TN8.3	Tunisie	A10	-
TN1.21	Tunisie	ALG423-406	Algérie
F83005.9	France	DZA315.16	Algérie

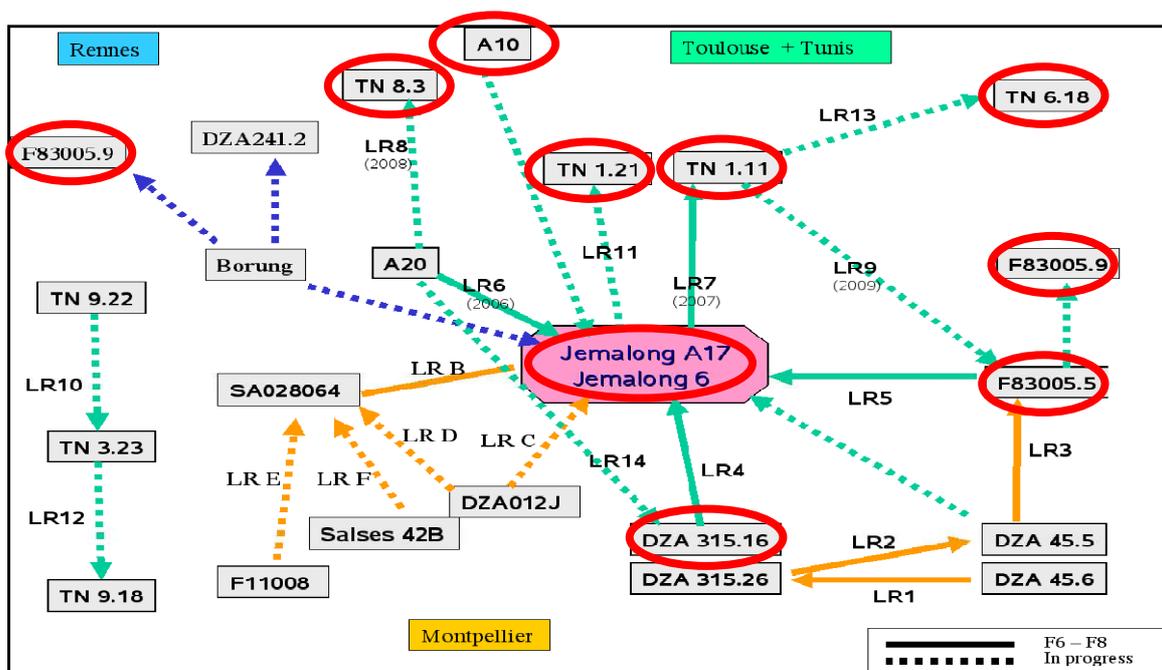


Fig. 7 : Populations de cartographie créées et en cours de création chez *M. truncatula* (Foroozafar, 2008). Les lignées étudiées sont entourées par un cercle rouge.

2.5. Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé est un criss cross à raison de trois blocs. Chaque bloc est représenté par deux répétitions/lignée (plants). Les deux facteurs étudiés sont : lignées et régime hydrique. Les lignées étudiées sont au nombre de 10, auxquelles deux régimes hydriques sont appliqués : un déficit à 80% de la RU ou bien on maintient à l'ETM, sans aucune restriction hydrique.

2.6. Caractères étudiés

- **Longueur du rameau (LB) :** mesuré sur la tige principale avant l'application du stress hydrique (LT0) et après la fin de chaque cycle de stress (LB1, LB2, LB3) ;
- **Nombre d'entre-nœuds (IN) :** relevé avant l'application du stress hydrique (NE0) et après la fin de chaque cycle de stress (IN1, IN2, IN3) ;
- **Date de floraison (FD) :** relevée après apparition de la première fleur de chaque plante et calculée en nombre de jours à partir de la date de semis ;
- **Nombre de gousses sur les deux tiges principales (NP3) :** noté au 3^{ème} cycle de stress ;
- **Poids total des gousses (TPW) :** noté après récolte sur l'ensemble des gousses produites par chaque plante ;
- **Nombre de graines par gousse (MSN) :** noté après récolte sur un échantillon de 30 gousses et représente le nombre moyen de graines dans chaque gousse ;
- **Nombre total de gousses (TPN) :** représente le nombre total de gousses produites par plante (pot) en fin de stress ;

- **Nombre total de graines par plante (TSNP) :** calculé en multipliant le nombre de graines par gousse par le nombre total de gousses en fin de stress ;
- **Poids moyen des gousses (MPW) :** calculé par la division du poids total des gousses sur le nombre total des gousses.

2.7. Analyses statistiques

Pour cet essai et afin de faire ressortir les différences qui existent entre les 10 lignées testées en situation de déficit hydrique et à l'ETM nous avons fait une analyse de variance en utilisant la fonction 'strip.plot' du package 'agricolae' avec le logiciel R (R Development Core Team, 2011). L'effet lignée a été testé par rapport à l'interaction Bloc*Lignée et l'effet traitement a été testé par rapport à l'interaction bloc*traitement. L'interaction lignée*traitement a été testé par rapport à la résiduelle. Les moyennes des lignées dans chaque situation ont été calculées afin de les utiliser dans le calcul de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et des matrices de corrélations. L'ACP a été calculée par le logiciel R en utilisant la fonction PCA du package 'FactMineR'. L'objectif est de faire ressortir les similitudes et/ou les différences qui existent entre les 10 lignées en fonction des caractères phénotypiques étudiés.

3. Résultats

3.1. Analyse de variance et effet du stress hydrique sur les paramètres notés

3.3.1. Longueur du rameau (LB)

L'analyse de variance pour la longueur du rameau a permis de déceler une très grande variabilité au sein des 10 lignées étudiées et ceci avant et après application du stress hydrique. L'effet traitement n'a eu d'impact sur ce paramètre, qu'à partir du deuxième cycle de stress. L'interaction entre les deux effets étudiés a été significative durant les trois cycles de stress appliqués (Annexe 2). La lignée A17 s'est distinguée par la longueur de rameau la plus élevée alors que la lignée F83005.9 a donné les valeurs les plus faibles et ceci après avoir subi les trois cycles successifs de stress hydrique (Fig. 8).

La comparaison entre la longueur du rameau en condition irriguée par rapport à la condition de déficit hydrique a permis de mettre en évidence une réduction progressive de la longueur au fur et à mesure que les cycles se succèdent avec une réduction allant de 6 à 35% en moyenne (Annexe 2). La lignée la plus touchée par l'effet du déficit hydrique a été TN1.11 avec une réduction de 47% alors que TN6.18 n'a subi que 10% de réduction (Annexe 6).

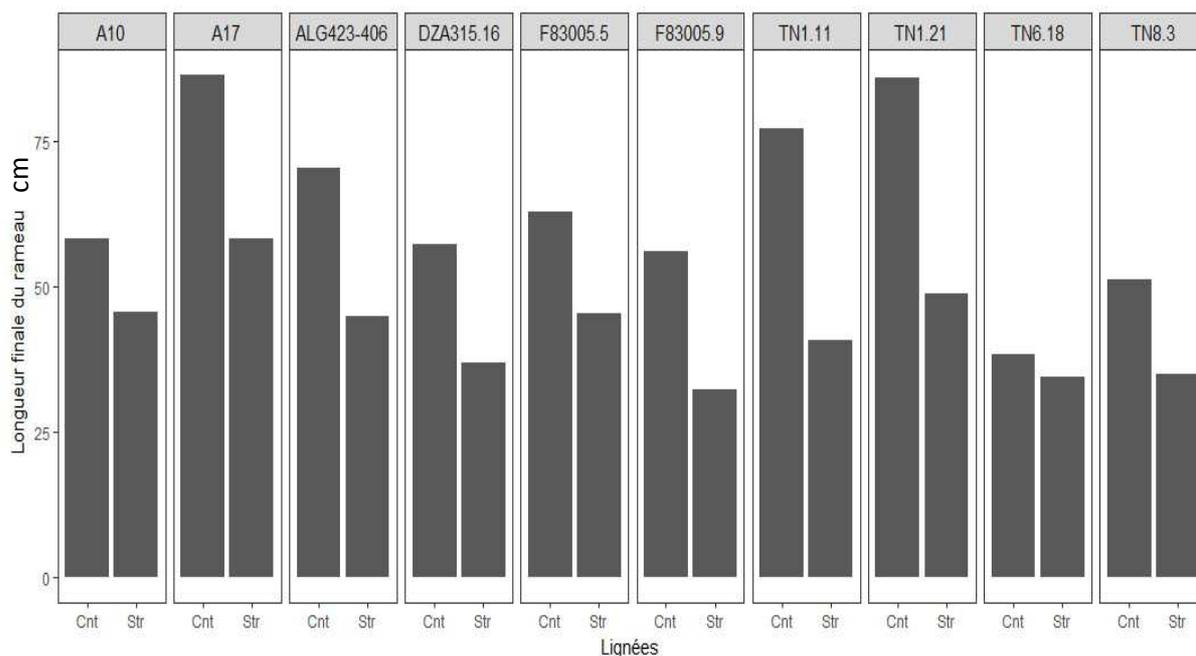


Fig. 8 : Effet des traitements hydriques sur la longueur du rameau par lignée après le 3eme cycle de stress hydrique (Cnt : Contrôle, Str : Stressé)

3.1.2. Nombre d'entrenœuds (IN)

La comparaison entre les moyennes des différentes lignées à travers une analyse de variance a révélé un effet très hautement significatif pour l'effet lignée avant l'application du stress hydrique. Des différences hautement à très hautement significatives ont aussi été enregistrées après application des trois cycles de stress hydrique (Annexe 3). L'effet traitement par contre n'a pas été significatif au premier cycle mais significatif à hautement significatif après l'application du deuxième et le troisième cycle respectivement (Annexe 3). L'interaction entre les deux facteurs étudiés n'a été significative qu'en deuxième cycle de stress hydrique (Annexe 03). Le nombre d'entrenœuds le plus élevé a été noté chez la lignée TN6.18 alors que F83005.9 a donné le nombre le plus faible (Fig. 9).

Nous avons remarqué aussi que le nombre d'entrenœuds a été influencé par la succession de cycle de stress hydrique appliqués, puisque au premier cycle la réduction de nombre d'entrenœuds entre les deux conditions hydriques était en moyenne de l'ordre de 6%, seulement au deuxième et troisième cycle, ce taux a augmenté pour devenir 14 et 23% respectivement. Les lignées TN1.11 et F83005.9 ont été les plus influencées par l'effet du stress hydrique avec une réduction de 29% alors que TN8.3 a été la moins touchée avec seulement 13% de réduction (Annexe6, Fig. 9).

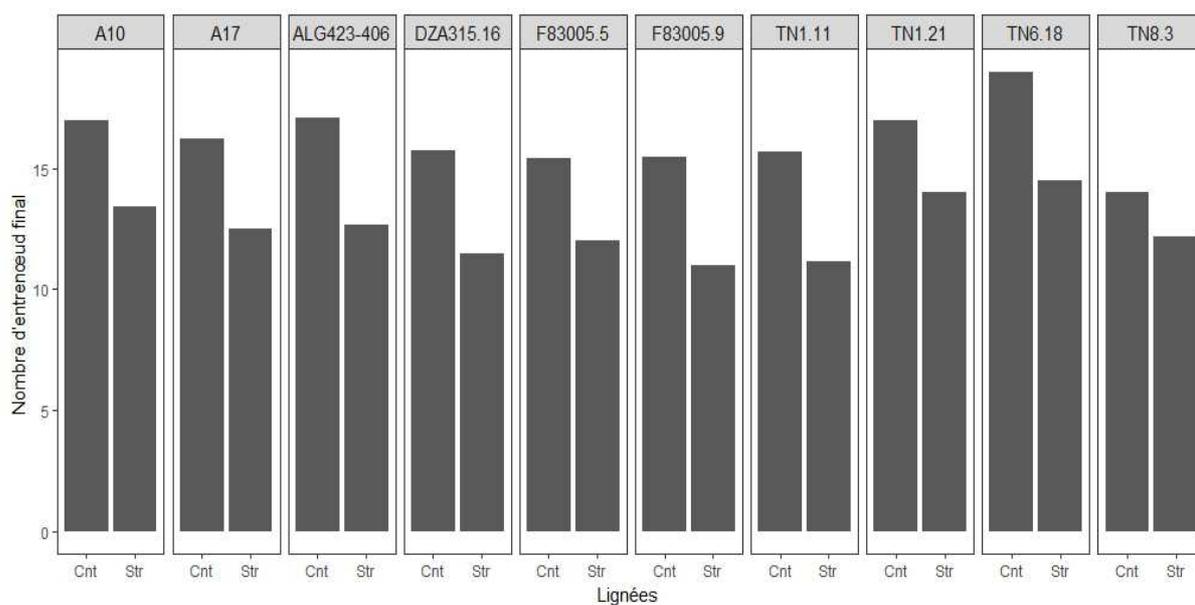


Fig. 9 : Effet des traitements hydriques sur le nombre d'entreœuds par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.1.3. Date de floraison (FD)

Une très grande diversité a été observée pour la date de début floraison chez les 10 lignées étudiées et l'analyse de variance a été très hautement significative pour ce paramètre (Annexe 4). La lignée la plus précoce a été A10 avec 60 jours après semis, alors que la lignée ALG423-406 a été la plus tardive pour fleurir avec 13 jours de plus par rapport à A10. Les lignées TN1.11 et A17 ont donné des valeurs intermédiaires (65 et 70 jours) (Fig. 10).

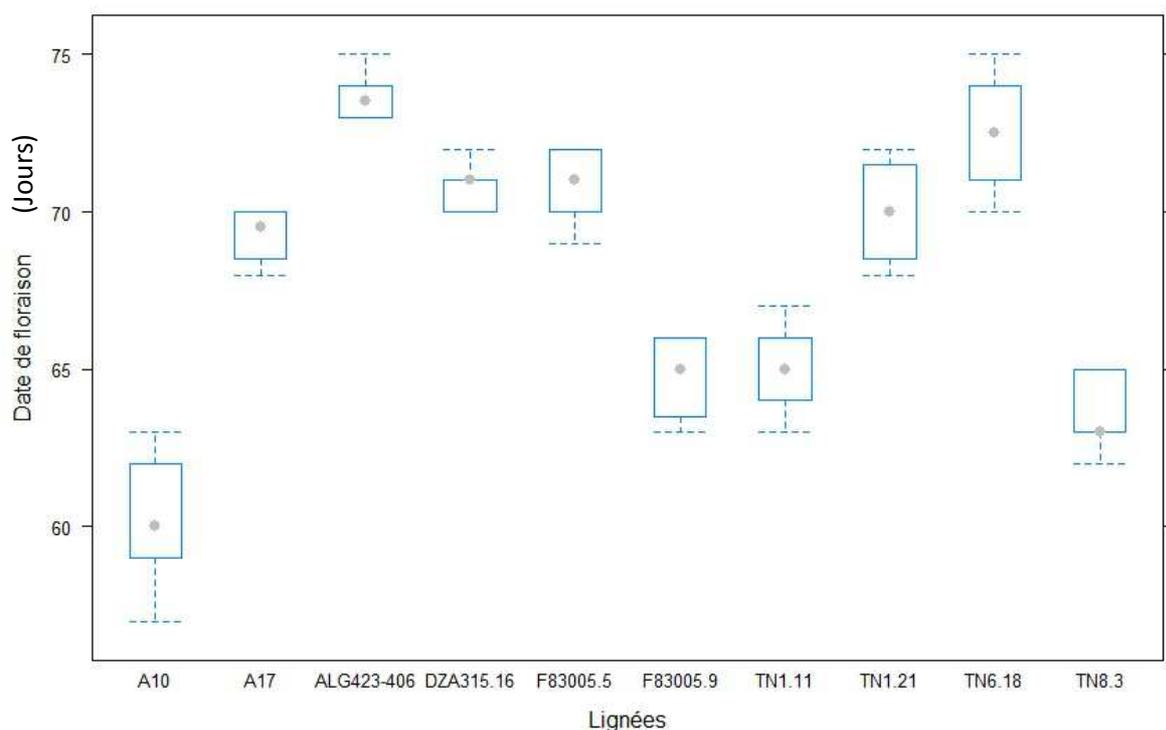


Fig. 10 : Diversité de la date de floraison pour les 10 lignées de *M. truncatula* en condition irriguée

3.1.4. Nombre de graines par gousse (MSN)

Pour le nombre de graines par gousse, l'effet du traitement hydrique a été significatif mais le taux moyen de réduction entre les deux traitements était seulement de 5%. La lignée la plus sensible a été F83005.5 avec 12% de réduction et les lignées la moins affectée par le stress hydrique sont F83005.9 et A10 avec seulement 1% de réduction pour le caractère nombre de graines par gousse (Annexe 6, Fig. 11).

La comparaison entre les moyennes des 10 lignées étudiées a révélée des différences très hautement significatives (Annexe 5). Les lignées A17 et TN1.11 se sont distinguées par le nombre de graines le plus élevé, ce qui représente une différence de plus de 50% par rapport à TN6.18 et A10 qui ont donné les valeurs les plus faibles. L'interaction entre les deux facteurs étudiés a été non significative ; c'est-à-dire que le classement des lignées est resté le même quel que soit le traitement hydrique (Annexe 5).

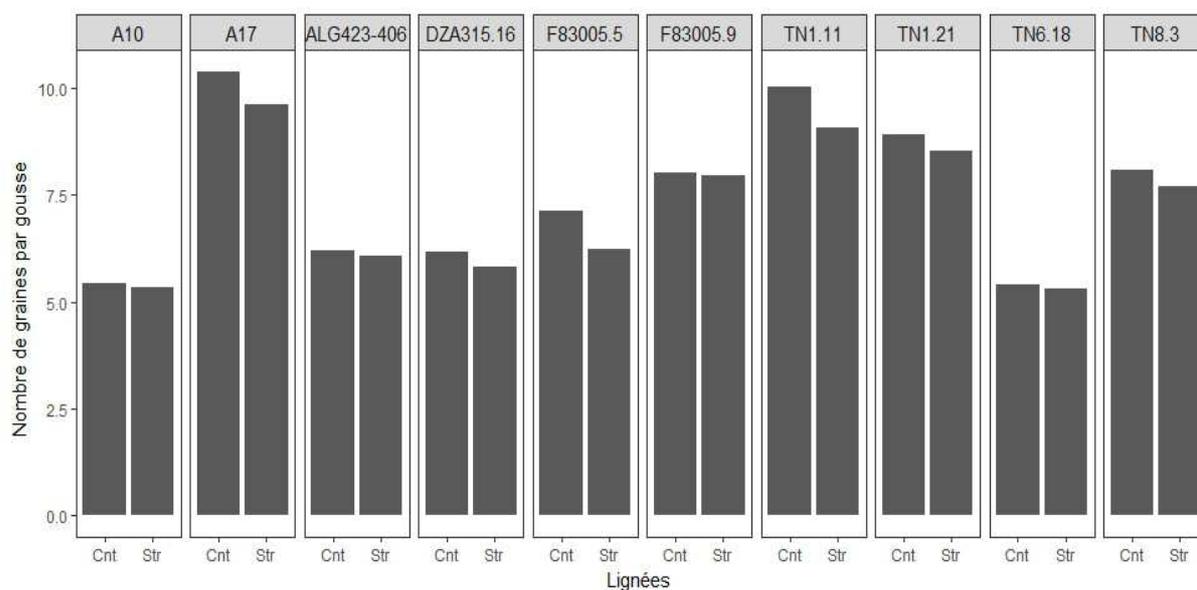


Fig. 11 : Effet des traitements hydriques sur le nombre de graines/gousse par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.1.5. Nombre total de gousses (TPN)

L'analyse de variance pour le nombre total en gousses a révélé une interaction hautement significative entre les deux facteurs étudiés. Elle a aussi montré des différences très hautement significatives entre les lignées, révélant une très grande variabilité génétique pour ce paramètre. Une différence hautement significative a été enregistrée aussi entre la condition stressée (déficit hydrique) et la condition irriguée (Annexe 5).

La comparaison entre les lignées en condition contrôle a permis de classer les lignées ALG423-406, DZA315.16, TN1.11, F83005.9 en tête de liste en terme de production de gousses, alors que les lignées A10 et A17 ont donné les valeurs les plus faibles (Fig. 12). En condition de déficit hydrique les lignées ont accusé une chute de production de gousses qui dépasse les 70% en moyenne (Annexe 5). Malgré cela les lignées ALG423-406, DZA315.16, F83005.5, F83005.9 sont restées les plus productives dans ces conditions de même que les lignées A10 et A17 sont restées les moins productives. La lignée TN1.11 a été la plus affectée par l'effet du stress hydrique avec une réduction de plus de 83%. Par ailleurs les lignées TN6.18 et A10 ont été les moins affectés avec une réduction d'environ 54 et 57% respectivement (Annexe 6).

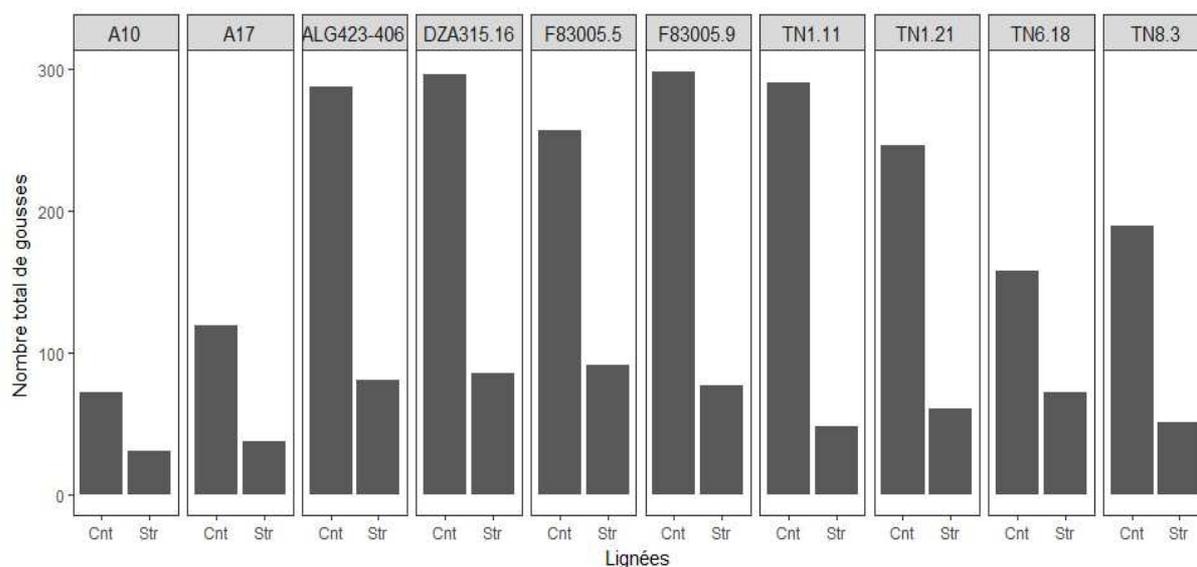


Fig. 12 : Effet des traitements hydrique sur le nombre total de gousses par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.1.6. Poids total des gousses (TPW)

Des différences très hautement significatives ont été mises en évidence entre les lignées pour le poids total des gousses. L'effet de chaque facteur a été significatif et l'interaction très hautement significative (Annexe 5).

La comparaison entre les lignées a montré que quel que soit le traitement hydrique TN1.11 a donné le poids total des gousses le plus élevé (Fig. 13). Cependant, elle reste avec TN1.21 les lignées les plus affectées par le stress hydrique appliqué avec des réductions de plus de 80 à 84% respectivement (Annexe 6). Réciproquement, A10 a donnée le TPW le moins élevé dans les deux conditions de traitement hydrique et accuse le taux de réduction le plus faible avec 57% (Fig. 13).

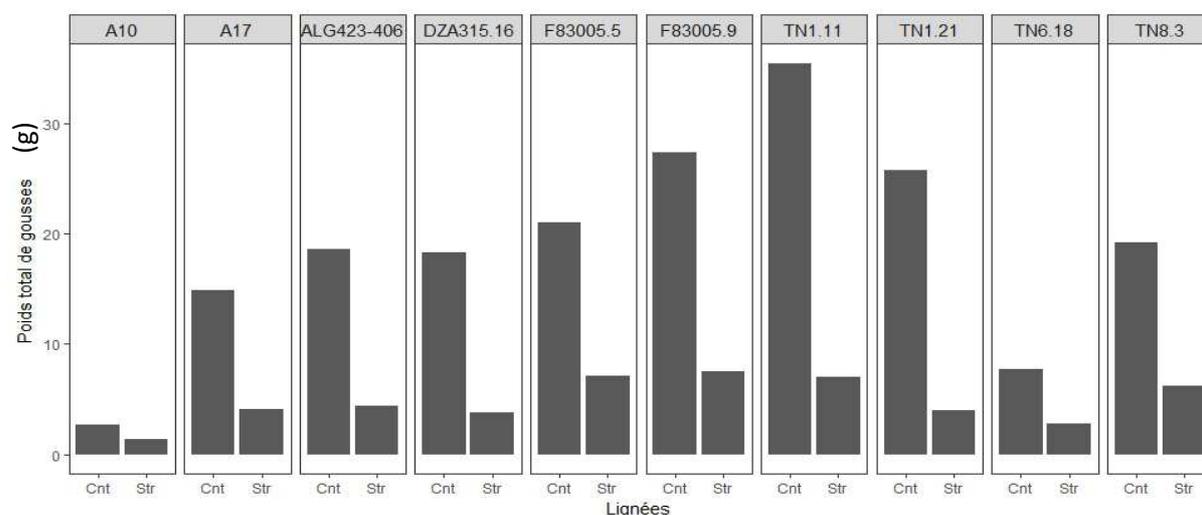


Fig. 13 : Effet des traitements hydriques sur le poids total des gousses par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.1.7. Nombre total de graines par plante (TSNP)

Une interaction très hautement significative a été révélée entre les deux facteurs étudiés pour le nombre total de graines par plante. L'application d'un stress hydrique a eu effet très important sur ce paramètre, causant une diminution moyenne d'environ 74% entre les deux conditions expérimentales (Annexe 5). Une très grande variabilité entre les lignées a aussi été mise en évidence avec des différences très hautement significatives (Annexe 5). En situation irriguée, TN1.11 a donné le TSNP le plus, élevé alors que A10 a donné les valeurs les plus faibles. En condition de déficit hydrique, les lignées F83005.5 et F83005.9 ont été les plus performantes pour ce paramètre contrairement à A10 qui maintient sa faible production (Fig. 14).

La comparaison entre les performances des lignées dans les deux situations hydriques a montré que la lignée TN1.11 a été la plus touchée par l'effet du stress avec une diminution d'environ 85% en nombre de graines. Par contre TN6.18 a été la moins affectée avec une réduction d'environ 56% (Annexe 6).

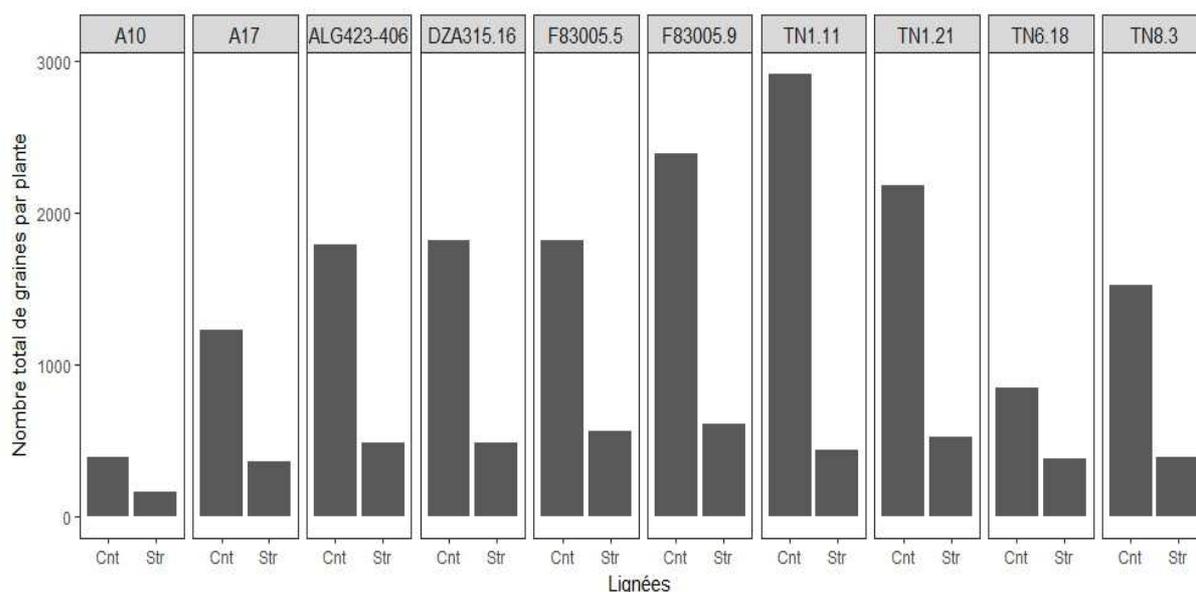


Fig. 14 : Effet des traitements hydriques sur le nombre total de graines par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.1.8. Poids moyen des gousses (MPW)

Pour le poids moyen des gousses, l'analyse de variance n'a pas révélé d'effet pour le facteur traitement hydrique, par contre des différences très hautement significatives ont été mises en évidence entre les lignées. L'interaction a été significative entre les deux facteurs étudiés (Annexe 5). En effet, en comparant les deux situations hydriques on trouve que les lignées DZA315.16, TN1.21, TN 6.18 ont subi une diminution de leur MPW qui varie entre 22 à 37%, alors que d'autres lignées (A10, TN1.11, TN8.3, F83005.9) ont donné un poids moyen de

gousses plus élevé en condition contrôle qu'en condition de déficit hydrique (Annexe 6, Fig. 15).

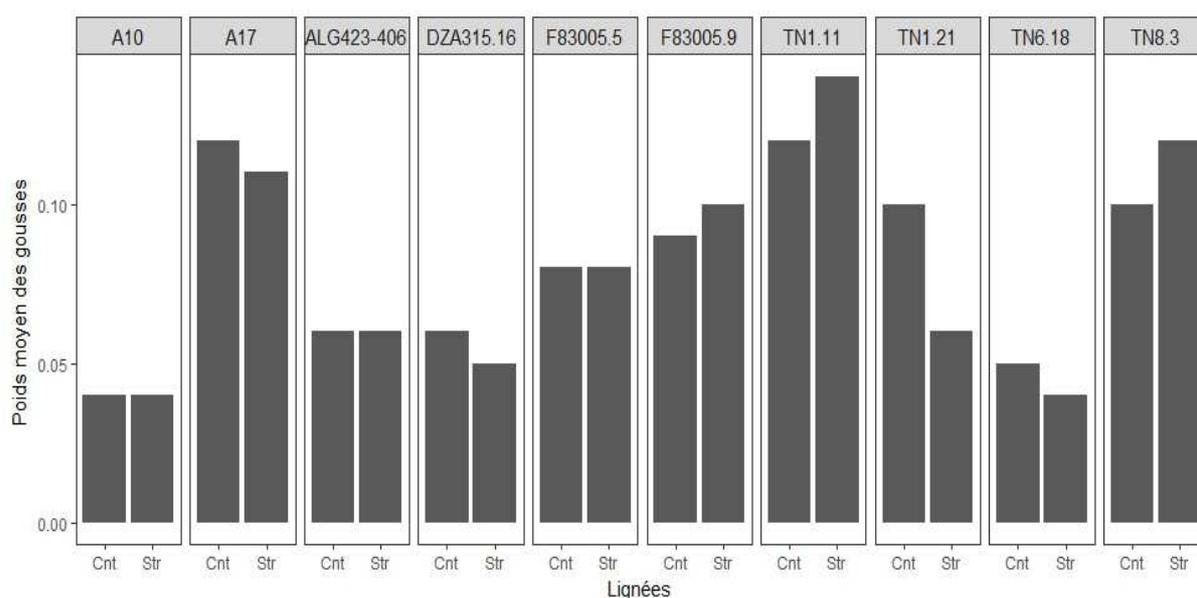


Fig. 15 : Effet des traitements hydriques sur le poids moyen des gousses par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.1.9. Nombre de gousses sur les deux tiges principales (NP3)

L'analyse de variance a révélé des différences très hautement significatives entre les lignées. L'effet traitement a été significatif et l'interaction entre les deux facteurs hautement significative (Annexe 5).

En condition irriguée, les lignées TN1.11 et TN1.21 ont donné le nombre le plus élevé en gousses avec une différence d'environ 30% par rapport à TN8.3 et A17 qui ont donné les plus faibles moyennes. En condition de déficit hydrique, c'est la lignée F83005.9 qui s'est distinguée avec une production de gousses de 25% plus élevée que celle de A17 (classée la dernière) (Annexe 6).

La comparaison entre les deux conditions hydriques révèle une chute importante dans le nombre de gousses pour pratiquement toutes les lignées avec une variation allant de 50% chez TN8.3 jusqu'à 77% chez TN1.11 (Fig. 16).

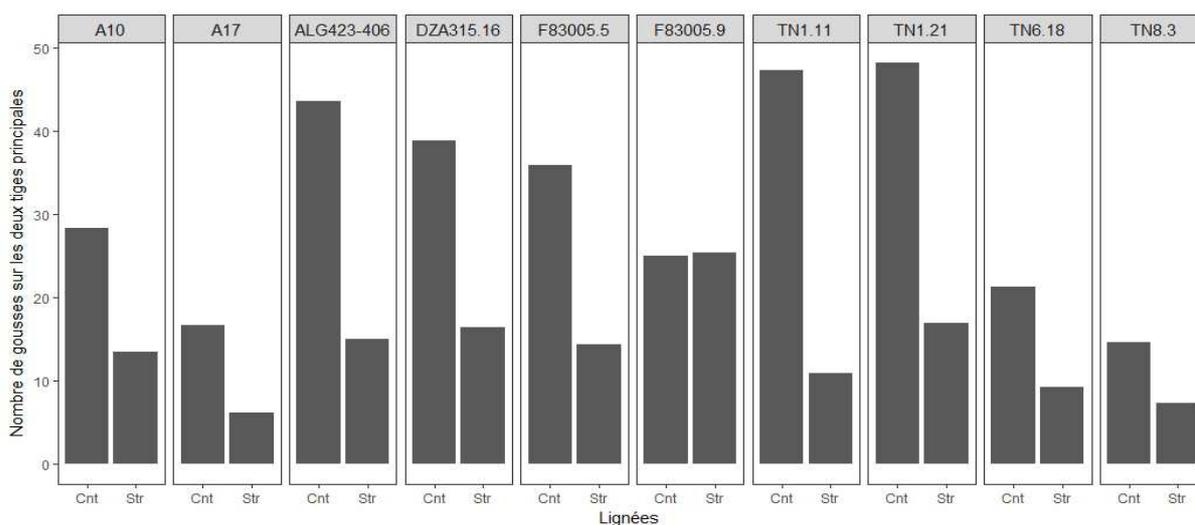


Fig. 16 : Effet des traitements hydriques sur le nombre de gousses/deux tiges principales par lignée (Cnt : Contrôle, Str :Stressé)

3.2.Analyse de corrélations

L'analyse des corrélations entre les différents caractères en condition contrôlée a révélé des corrélations fortes et significatives entre le nombre moyen de graines par gousse (MSN) et respectivement la longueur de la tige (LB3 ; 0.73) et le poids total des gousses (TPW ; 0.66), ainsi qu'entre le nombre de gousses (NP3) et le poids total des gousses (TPW). Des corrélations hautement significatives ont été révélées entre le poids total des gousses (TPW) et les paramètres nombre total de gousses (TPN) ainsi que le nombre de total de graines par plante (TSNP). La corrélation entre le nombre de graines par plante (TSNP) et le poids total des gousses (TPN) a été très hautement significative (Fig. 17).

En condition de déficit hydrique, le nombre de graines par plante (TSNP) présente, d'une part, une corrélation significative avec le poids total des gousses (TPW) et d'autre part, une corrélation hautement significative avec le nombre total des gousses (TPN). Le nombre d'entre-nœuds au 3^e cycle (IN3) est corrélé négativement au poids total des gousses (TPN) (Fig. 18).

L'analyse de corrélation effectuée entre les deux conditions expérimentales (stressée, non stressée) a révélé des corrélations significatives à très hautement significatives pour tous les paramètres étudiés (Annexe 10).

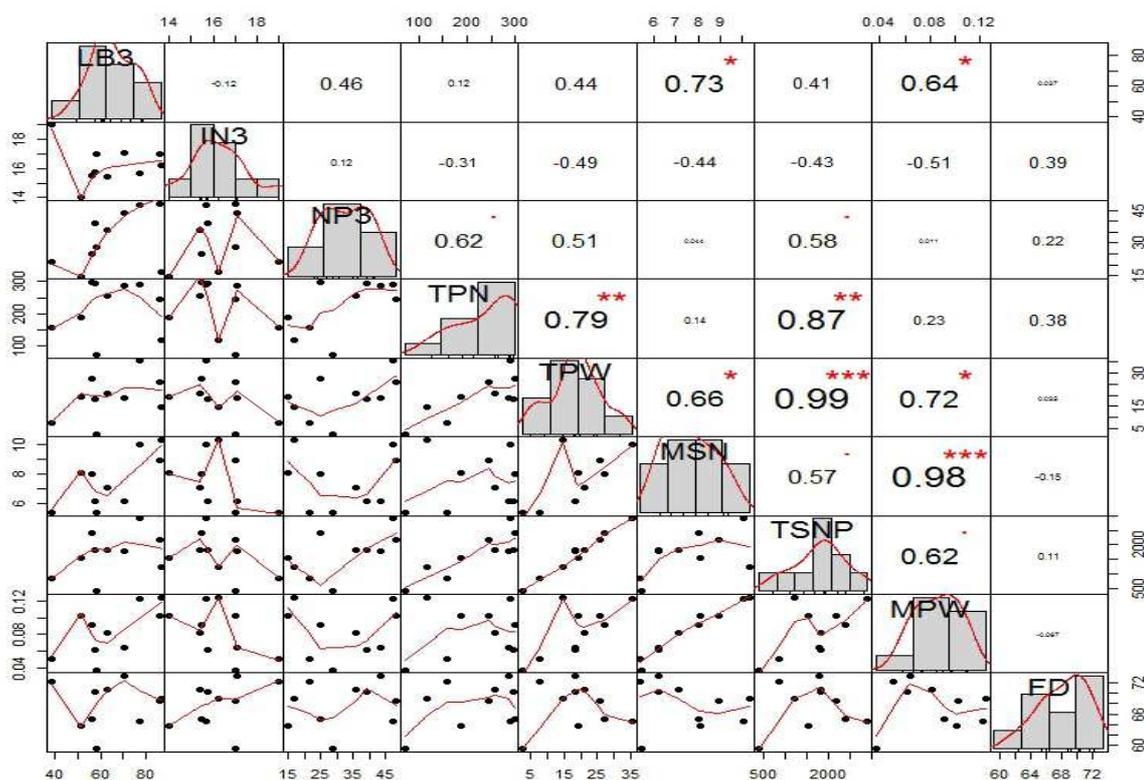


Fig. 17 : Matrice des corrélations pour les différents paramètres en condition contrôlée

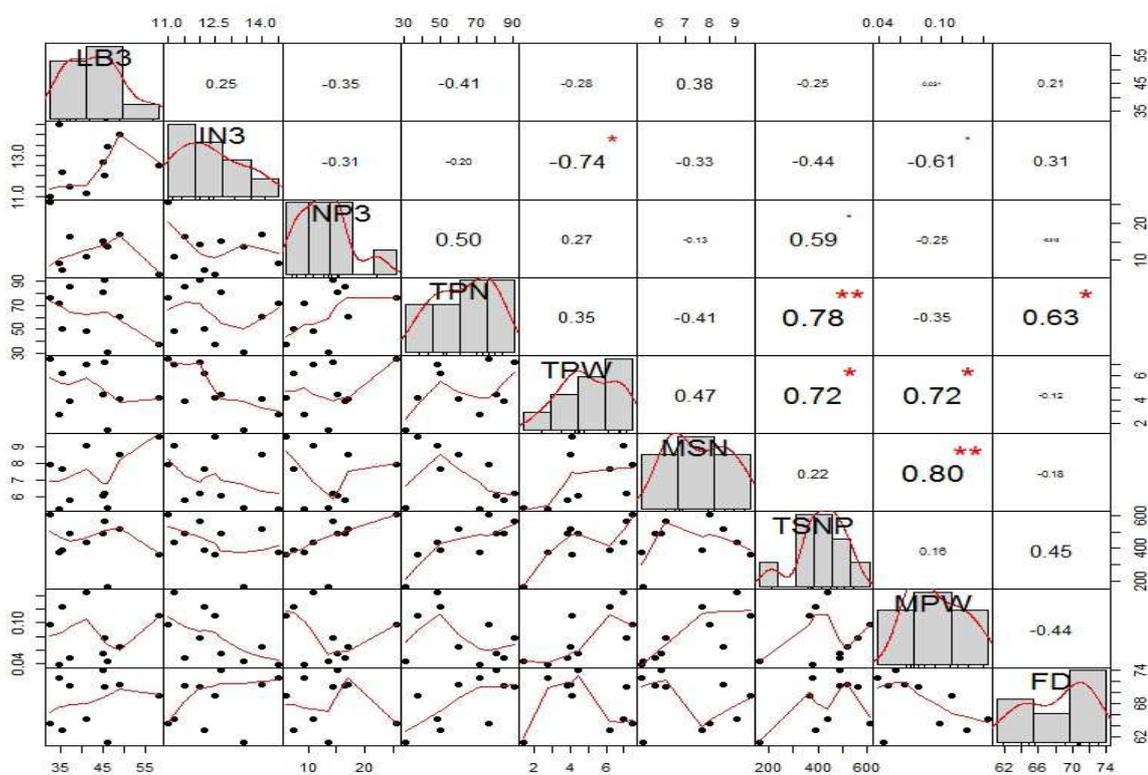


Fig. 18 : Matrice des corrélations entre les différents caractères en condition de déficit hydrique.

3.3. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales appliquée sur les caractères en condition non stressante a révélé deux axes principaux expliquant respectivement 44.38% (axe 1) et 27.57% (axe 2) de la variabilité observée (Fig. 19 et 20). Les caractères longueur de la tige ainsi que le nombre d'entrenœuds (LB1, LB2, IN1, IN2) ont participé positivement à la construction du premier axe (Fig. 20). Le deuxième axe est corrélé positivement avec le nombre d'entrenœuds et la date de floraison ; par contre, il est corrélé négativement avec le poids moyen des gousses et le nombre moyen de graines par gousse (Fig. 20).

L'ACP a permis de mettre en évidence une très grande variabilité génétique entre les différentes lignées (Fig. 19). La lignée TN1.21 s'est distinguée par un nombre de gousses, un nombre total de graines par gousse et un poids total des gousses élevés ainsi que des tiges longues, contrairement aux lignées TN6.18, TN8.3 et A10 (Fig. 19). Les lignées TN1.11 et TN8.3, contrairement de la lignée TN6.18 ont développé moins d'entrenœuds (IN0, IN3) et ont été plus précoces pour fleurir, par conséquent elles ont produit moins de graines par gousse et ont donné un poids moyen des gousses faible. La lignée algérienne DZA 315.16 s'est distinguée par le nombre de gousses et de graines par gousse le plus élevé en comparaison avec la lignée A10 et la lignée de référence A17 (Jemalong) qui ont donné une production plus faible (Fig. 19).

L'analyse en composante principale appliquée sur des caractères notés en condition de déficit hydrique (Fig. 21 et 22) a révélé deux axes importants expliquant respectivement 39.46% (axe 1) et 30.82% (axe 2) de la variabilité. Les caractères poids total des gousses et nombre total de graines par plante sont corrélés positivement à l'axe 1 ; alors que le nombre d'entrenœuds, au deuxième et troisième cycle de stress, sont négativement corrélés à cet axe. Le deuxième axe est positivement corrélé au nombre moyen de graines par gousse et au poids moyen des gousses. Par contre, il est négativement corrélé au nombre total de gousses (Fig. 21). Les individus projetés sur les deux premiers axes révèlent une grande variabilité génétique et des réponses différentes au stress hydrique appliqué. Les lignés TN1.11 et F83005.9 se sont distinguées par un poids total des gousses et un nombre total de graines par plante plus élevé et un nombre d'entrenœuds plus faible en comparaison aux lignées TN6.18, A17 et A10 qui ont eu un comportement contraire. La lignée TN 6.18 s'est distinguée aussi par un poids moyen des gousses, un nombre moyen de graines par gousse plus faibles en comparaison à la lignée A17 (Fig. 22).

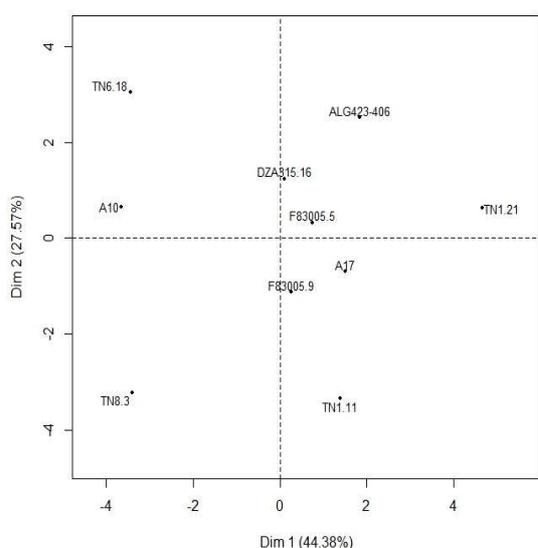


Fig. 19 : Graphe des individus montrant la répartition des lignées en condition contrôle

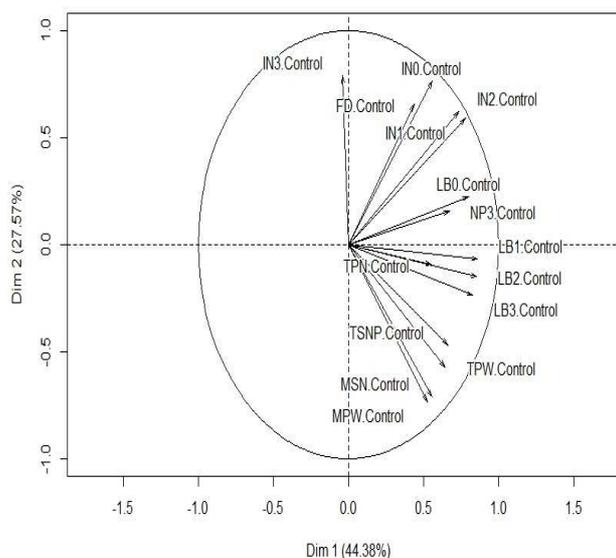


Fig. 20 : Cercle des corrélations entre les différents paramètres en condition contrôle

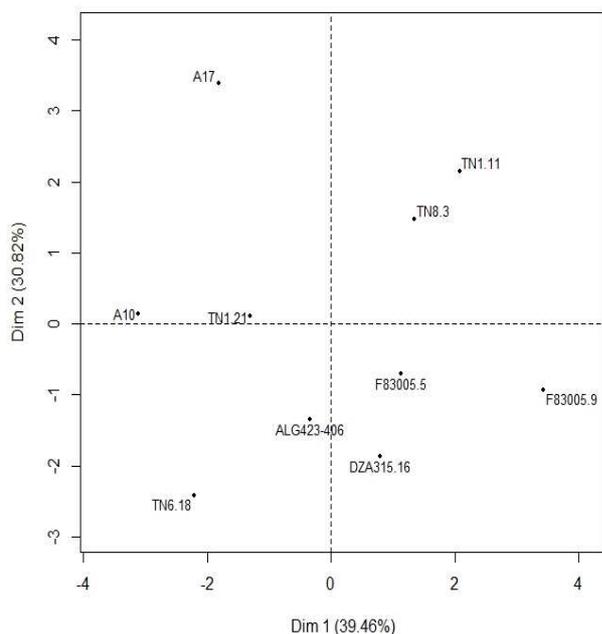


Fig. 21 : Graphe des individus montrant la répartition des lignées en condition de stress hydrique.

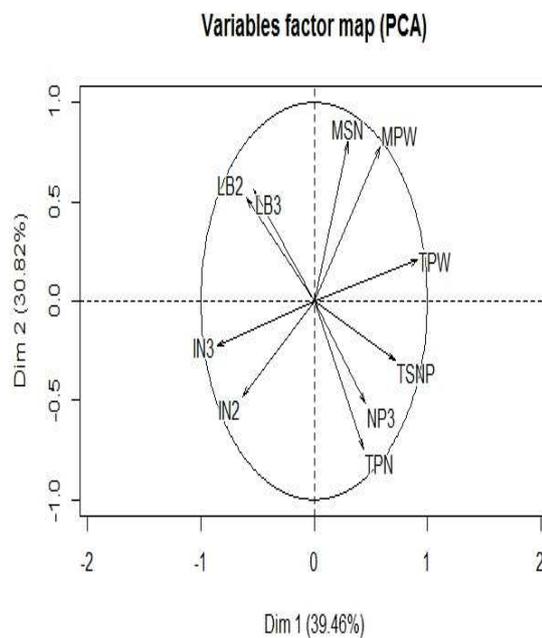


Fig. 22 : Cercle des corrélations entre les différents paramètres en condition de stress hydrique

Classification ascendante hiérarchique (CAH)

A partir des caractères étudiés, on a réalisé un arbre de classification hiérarchique basé sur les distances Euclidiennes et représenté par une distance d'agrégation (Fig. 23). Cette analyse a permis de regrouper au sein d'une même classe les lignées semblables possibles et les distinguées des autres classes (Fig. 23). A une distance d'agrégation égale à 2, on distingue quatre groupes distincts : i) A17, TN1.21 ; ii) ALG423-406, F83005.5, F83005.9, DZA315.16 ; iii) TN8.3, TN1.11 ; iv) TN6.18, A10 (Fig. 23).

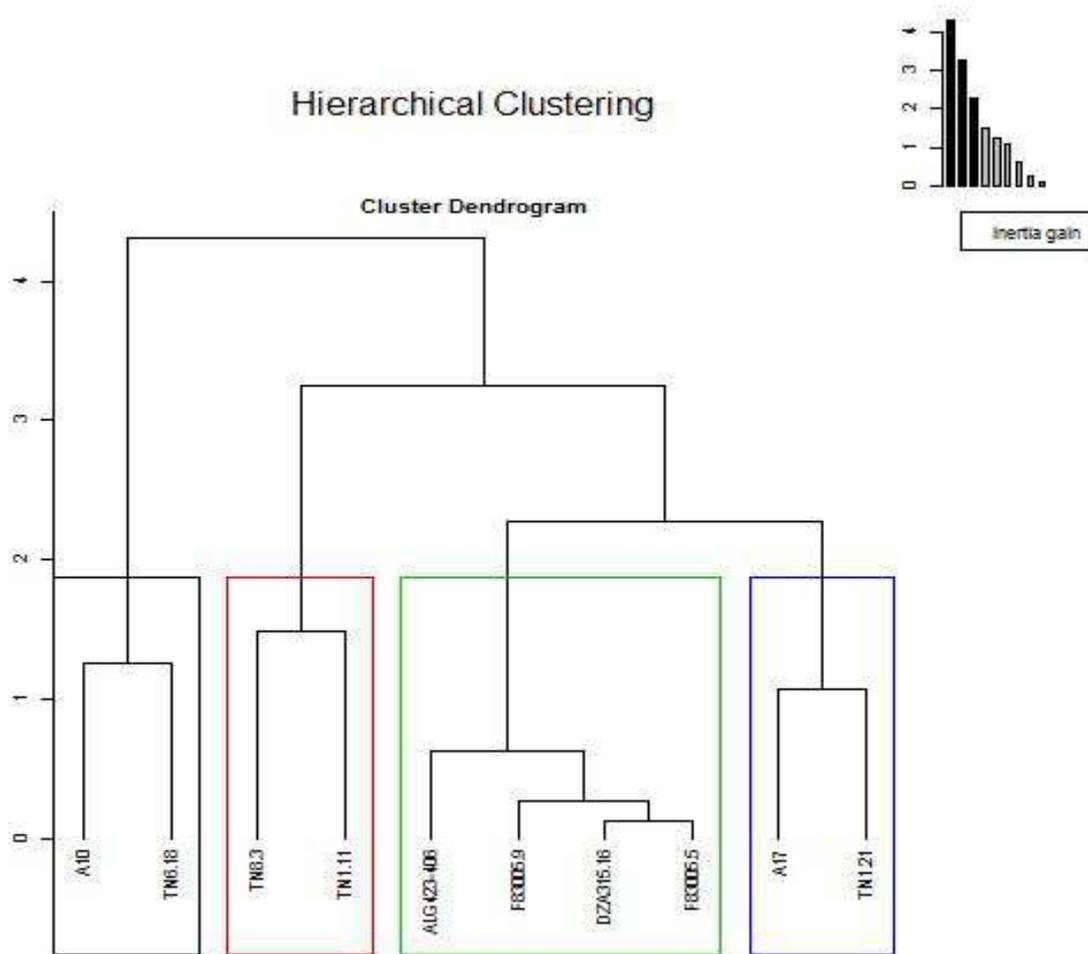


Fig. 23 : Classification ascendante hiérarchique (méthode de Ward) des 10 lignées de *M. truncatula* basée sur les distances euclidiennes.

4. Discussion et conclusion générale

Dans l'objectif de disséquer la variabilité génétique existante chez 10 lignées de *M. truncatula* soumises à deux conditions de régimes hydriques (stressée et non stressée), un stress hydrique a été appliqué en fin de saison (après floraison) d'une manière progressive et cyclique.

L'analyse de variance pour les dix lignées soumises ou non à une contrainte hydrique a révélé un effet significatif du traitement, du génotype et de leur interaction pour la majorité des caractères de fitness étudiés.

Les résultats obtenus montrent une très grande variabilité génétique entre les lignées étudiées et ceci que ce soit en condition non stressée ou stressée. La variabilité génétique chez *M. truncatula* a été mise en évidence par plusieurs études, notamment sur des caractères agronomiques (Julier *et al.*, 2007), phénologiques (Pierre *et al.*, 2008), de résistance au stress salin (Arraouadi *et al.*, 2011 ; Foroozanzar *et al.*, 2014 ; Friesen *et al.*, 2014), de résistance au stress hydrique (Badri *et al.*, 2013, 2016) et de résistance à des maladies (Ben *et al.*, 2013).

D'autres études sur des populations naturelles d'espèces, comme *Arabidopsis lyrata* (Sletvold 2012), *Boechera hoelboelli* (Knight *et al.*, 2006), *Avena barbata* (Fletcher *et al.*, 2015) et *Brachypodium distachyon* (Luo *et al.*, 2011), ont aussi montré une très grande variabilité génétique en réponse au stress hydrique.

La comparaison entre les moyennes, obtenues en condition stressée avec celles obtenues en condition non stressée, met en évidence une diminution considérable pour la plupart des caractères étudiés. Notamment, pour le poids total des gousses (TPW), le nombre total de gousses (TPN) et le nombre total de graines par plante (TSNP). En comparaison avec les autres composantes du rendement, Stoker (1974) et Mouhouche *et al.* (1998) ont trouvé, dans des essais sur le haricot, que le nombre de gousses par plante est de loin le plus sensible à l'effet du stress hydrique. Des résultats similaires ont été trouvés sur quelques populations de *M. truncatula* (Chebouti and Abdelguerfi, 2000) et sur le pois chiche (Leport *et al.*, 2006)

Les études menées par Clarkson and Russell (1976), sur quelques espèces du genre *Medicago* dans des conditions de stress hydrique, suggèrent que ces espèces annuelles cherchent à éviter les conditions sèches par une floraison précoce, et par l'accélération du développement de certaines phases. En effet, la durée de la floraison a été significativement réduite chez *M. truncatula* cv. Jemalong et l'intervalle de temps entre la première fleur et la première gousse a été réduit en condition de stress hydrique par rapport à la condition irriguée.

Une analyse de corrélation a été effectuée entre les deux conditions expérimentales (stressée, non stressée) et ceci pour tous les paramètres étudiés. Des corrélations positives et significatives ont été mises en évidence. En effet, des études similaires faites sur des espèces cultivées, ont permis de mettre en évidence des corrélations génétiques positives entre les différents caractères mesurés dans des conditions optimales d'irrigation et de sécheresse, notamment pour le rendement et ces composantes (Cattivelli *et al.* 2008). L'intérêt de faire ce genre d'analyse réside dans le fait qu'elle permet de démontrer dans quelle mesure ces paramètres sont-ils génétiquement corrélés dans des conditions en irrigué et de déficit en eau? En effet une corrélation génétique parfaite suggère que le même groupe de gènes contrôle la variation du caractère dans les deux conditions expérimentales: une corrélation positive révèle une action génétique cohérente alors qu'une corrélation négative révèle des compromis ou une action de gène antagoniste à travers les environnements (Juenger 2013). Ces résultats ont une importance capitale, puisque la sélection pour un meilleur rendement dans des conditions bien arrosées entraînera indirectement une augmentation du rendement sous stress en améliorant la vigueur générale (Juenger 2013).

L'analyse en composantes principales a permis aussi de révéler une grande variabilité entre les lignées, qui s'est traduit par des réponses différentes en présence d'un stress hydrique. Certaines lignées comme la lignée TN1.11 s'est distinguée par un poids total des gousses et un nombre total de graines par plante plus élevé en comparaison avec les lignées TN6.18, A17 et A10 qui ont eu un comportement contraire. En se basant sur ces résultats nous avons choisi les deux lignées A17 et TN1.11 comme parent d'une population de lignées recombinantes, indispensable pour l'analyse QTL. Le choix de ces génotypes parentaux repose sur le fait qu'ils soient contrastants pour la majorité des caractères de fitness étudiés mais, aussi au fait qu'ils sont connus pour être contrastants pour différents caractères morpho-physiologiques en condition de stress salins (Zahaf *et al.*, 2012 ; Foroozanfar *et al.*, 2014).

Chapitre III

Déterminisme génétique de caractères
végétatifs et de fitness en réponse à un
stress hydrique chez *M. truncatula*

Chapitre III : Déterminisme génétique de caractères végétatifs et de fitness en réponse à un stress hydrique chez *M. truncatula*.

1. Introduction

Sans aucun doute, la sécheresse est l'un des principaux stress abiotique au monde. Les pertes de rendement des cultures liées au stress causé par la sécheresse sont considérables. La sélection pour la résistance à la sécheresse constitue un challenge très important pour les chercheurs. Ceci est dû en partie à la complexité du phénomène mais aussi par ce que dans la réalité les plantes n'utilisent pas les mêmes mécanismes de résistance à la sécheresse que ce soit à l'échelle de la plante ou à l'échelle des gènes (Blum *et al.*, 2005).

Diverses approches ont été utilisées pour atténuer l'effet de la sécheresse sur les cultures. Les méthodes classiques et conventionnelles d'amélioration des plantes semblent être des moyens efficaces et économiques d'adaptation des cultures à des environnements propices à la sécheresse. Mais, bien que les sélectionneurs aient fait, au cours du siècle dernier, de grands progrès en développant des lignées ou des cultivars tolérants à la sécheresse pour certaines cultures sélectionnées, l'approche nécessite beaucoup de temps, beaucoup de main-d'œuvre et des coûts.

Comparé à l'approche classique l'utilisation des outils génomiques offrent des opportunités nouvelles pour disséquer les caractères quantitatifs à travers la détection et l'étude de leurs déterminants génétiques (QTL : quantitative trait loci) les plus simples (Morgante and Salamini, 2003) qui feront par la suite l'objet d'une sélection assistée par marqueurs (MAS) et éventuellement le clonage de ces QTL (Salvi and Tuberosa, 2005)

La tolérance des plantes à la sécheresse, comme pour les autres contraintes abiotiques, est contrôlée par différents gènes mineurs (polygènes) qui ont des effets additifs dans leur expression (Mohammadi *et al.*, 2005) et la cartographie de QTL permet d'évaluer les emplacements, les nombres, la magnitude des effets phénotypiques et le schéma d'action des gènes (Ashraf, 2010).

Pour une analyse QTL, l'évaluation phénotypique est effectuée à partir d'un grand nombre de plantes provenant d'une population ségréguée, à partir de lignées contrastées pour les caractères recherchés, pour une variété de marqueurs génétiques ; alors une partie ou toute la population est génotypée ; et enfin une analyse statistique appropriée est effectuée pour identifier les loci qui contrôlent un trait (Asíns, 2002).

La détermination de QTL pour des caractères de tolérance à la sécheresse a été réalisée sur différentes cultures et en grande partie ceci a été réalisé grâce à l'étude des «espèces modèles», à savoir, les espèces dont la génétique et la génomique sont plus traitables que dans de nombreuses plantes cultivées.

Chez les graminées, les exemples les plus importants concernent le blé (Valkoun, 2001), l'orge (Verhoeven *et al.*, 2004), le maïs (Prasanna, 2012), et le riz (Sakai and Itoh, 2010 ; Menguer *et al.*, 2017). Chez les légumineuses aussi, en comparaison avec les graminées, l'identification de QTL de résistance à la sécheresse a suscité un engouement remarquable pour cette approche (Cattivelli *et al.*, 2008), notamment pour la lentille (Idrissi et al. 2016; Singh et al. 2016), le pois chiche (Hamwiah et al. 2013; Varshney et al. 2014) et le haricot (Miklas et al. 2006).

Dans la pratique et lorsque la variation génétique disponible chez une espèce n'est pas suffisante pour apporter des améliorations concernant la résistance à la sécheresse, les recherches sont généralement orientées vers les espèces sauvages adaptées à des environnements secs et à partir desquelles de nouvelles variantes alléliques sont exploitées (Abberton *et al.*, 2016). Mais contrairement aux graminées, les légumineuses n'ont pas reçu la même attention en ce qui concerne l'utilisation de leurs parents sauvages pour la sélection de nouveaux cultivars et l'amélioration de leurs résistance aux stress environnementaux (Gentzbittel et al., 2015).

Dans cette perspective, nous nous sommes basés sur les résultats du chapitre II pour choisir la population de RILs (LR7) issue du croisement entre les deux parents TN1.11 et A17, afin d'entreprendre une analyse QTL et tenter d'examiner l'architecture génétique des caractères de fitness en condition irriguées et en situation de déficit hydrique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Conduite de l'essai

Un essai a été répété durant deux années successives (03 février 2013 et 03 février 2014). La méthode utilisée pour le semis et celle utilisée pour l'application du stress hydrique sont semblables aux méthodes utilisées dans le premier essai de l'étude de la variabilité génétique (chapitre II).

2.2. Matériel végétal

Afin d'identifier des QTL expliquant la variabilité génétique observée, nous avons utilisé la population de lignées recombinantes LR7 (chapitre II, Fig. 07), issue du croisement entre les deux génotypes (Lignées pures) TN1.11 et A17.

La population de lignées recombinantes (appelée LR7) que nous avons utilisée comporte 150 lignées recombinantes (RILs) en génération F6, issue du croisement des deux parents TN1.11 x A17. Tous les géotypes sont des lignées pures obtenus d'une seule plante par la technique « Single Seed Descendant », par le laboratoire EcoLab du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) de Toulouse.

2.3. Carte génétique

La carte génétique issue de ce croisement a été réalisée à partir d'une population de 192 RILs et 146 marqueurs SSR en se basant sur le résultat du séquençage du génome de *Medicago truncatula* (Young *et al.*, 2011) (<http://www.medicagohapmap.org/?genome>). La carte obtenue couvre 470 cM avec une moyenne d'intervalles entre marqueurs de l'ordre de 3.28 cM (Tab. 03, Fig. 27).

Tab. 03 : Distribution des marqueurs sur les 8 groupes de liaison

Groupe de liaison	Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Distance moyenne (cM)
1	28	80.70	2.88
2	17	61.60	3.62
3	15	53.40	3.56
4	14	47.50	3.39
5	25	73.60	2.94
6	13	44.20	3.40
7	18	55.60	3.09
8	16	53.40	3.34
Total	146	470	3.28
Pourcentage géotypé		93.2%	
Géotypes (%)		AA : 48.3	BB : 51.7

Avant de commencer à travailler avec cette carte, nous avons jugé intéressant de la recalculer une autre fois avec le logiciel JoinMap (Van Ooijen, 2006). Une fois la confirmation des groupes de liaison a été faite (Fig.25 ; 26 ; 27), notre carte de travail a été numérotée selon la carte publiée. L'analyse de cartographie génétique a été réalisée à l'aide du package R-QTL du logiciel R (Broman *et al.*, 2003).

2.4. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental adopté pour les deux essais (2013-2014) est un 'Split plot augmented design'. L'intérêt de ce dispositif est qu'il a été conçu pour les essais qui génèrent un nombre très important d'unités expérimentales et qu'il serait très difficile d'installer ou de contrôler sur le terrain, plus particulièrement les études de QTL (Fédérer and Arguillas, 2006). Le facteur principal étudié, régime hydrique, est composé de deux traitements : stressé (déficit en eau) et non stressé (en irrigué) ; le deuxième facteur étudié est le facteur lignées. Chaque traitement est appliqué sur les 150 lignées RILs et les deux lignées parentales de croisement. Les 152 lignées



Fig. 24 : Différentes étapes de culture de *M. truncatula* : (A) le semis ; (B) la levée ; (C) stade début floraison ; (D) Application du stress hydrique ; (E) récolte des gousses.

sont réparties sur 14 blocs, dans chaque bloc nous avons 18 lignées (Fig.24). Les deux parents (A17 et TN1.11) ainsi que 6 autres lignées (128, 208, 203, 78, 87, 203) ont été reprises sur

chaque bloc (Lignées check) alors que pour le reste des lignées qui complètent les blocs, elles ont été choisies aléatoirement parmi les 144 RILs qui restent, mais elles ne sont utilisées qu'une seule fois.

2.5. Caractères étudiés

2.5.1. Les caractères notés avant application du stress hydrique

- **Vigueur hivernale (WV)** : notée de 1 (vigueur la plus faible) à 5 (vigueur la plus élevée) ;
- **Vigueur printanière (SV)** : notée de 1 (vigueur la plus faible) à 7 (vigueur la plus élevée) ;
- **Longueur de rameau (LB0)** : mesurée sur la tige principale avant l'application du stress hydrique en début floraison ;
- **Nombre d'entre-nœuds (IN0)** : relevé avant l'application du stress hydrique ;
- **Envergure de la plante (SP)** : calculée à partir de la moyenne des deux mesures perpendiculaires au diamètre de la plante ;
- **Nombre de ramifications (NB)** : représente le nombre de ramifications primaires, noté en début floraison ;
- **Date de floraison (FD)** : relevée après apparition de la première fleur de chaque plante et calculée en nombre de jours à partir de la date de semis.

2.5.2. Les caractères notés après application du stress hydrique

- **Nombre total de gousses par plante (TPN)** : représente le nombre total de gousses récoltées par plante et par pot en fin de stress ;
- **Poids total de gousses par plante (TPW)** : noté après la récolte sur l'ensemble des gousses produites par chaque plante ;
- **Nombre de graines par gousse (MSN)** : noté après la récolte sur un échantillon de 5 gousses et représente le nombre moyen de graines par gousse ;
- **Poids total des graines par gousse (TWSP)** : représente le poids total des graines présentent dans une gousse et calculé sur trois gousses ;
- **Poids moyen des graines (MSW)** : calculé par la division du poids total des graines par gousse sur le nombre de graines par gousse ;
- **Poids moyen des gousses (MPW)** : calculé par la division du poids total de gousses sur le nombre total de gousses ;
- **Longueur du rameau principal en fin de cycle (LB3)** : mesuré sur la tige principale après la fin du 3^e cycle de stress hydrique.

2.6. Analyses statistiques

2.6.1. Analyses de variance

Avant l'application du stress hydrique, l'analyse de variance a été calculée en prenant en considération l'effet bloc, et l'effet lignée selon un dispositif en bloc aléatoire. Après l'application du stress hydrique, l'analyse de variance a été calculée selon le dispositif expérimental 'split plot augmented design' (Fédérer and Arguillas, 2006). On prend en considération l'effet bloc, l'effet traitement et l'effet lignée ainsi que les interactions traitement*bloc et traitement*lignée. L'effet lignées est considéré comme aléatoire alors que l'effet traitement et l'effet bloc sont considérés comme fixes. L'effet bloc et l'effet lignée ont été testés par rapport à leurs interactions respectives avec l'effet traitement selon le modèle suivant :

$$Y = \mu + \text{traitement} + \text{bloc} + \text{bloc} * \text{traitement} + \text{Lignée} + \text{Lignée} * \text{Traitement} + \text{Résiduelle}$$

Les variances des lignées et de la résiduelle ont été estimées en modèle aléatoire par la fonction Lmer du package Lme4 du Logiciel statistique R, et ont servi par la suite à calculer l'héritabilité au sens large :

$$h^2 = \frac{\text{Var Lignée}}{\text{Var Lignée} + \text{Var Résiduelle}}$$

Les moyennes ajustées des lignées ont été calculées par la fonction lsmeans. Ces moyennes corrigées ont servi au calcul des corrélations entre les différents caractères étudiés avant et après l'application du stress hydrique.

2.6.2. Analyses de QTL

L'analyse QTL a été faite en utilisant le logiciel QTL Cartographer version 1.17 sous UNIX (Basten *et al.*, 2005) ainsi que le package RQTL sous R. L'analyse a été faite en utilisant les résultats du phénotypage et la carte génétique représentant les 150 lignées de la population RILs.

Afin d'identifier des QTL et d'estimer le pourcentage de variabilité phénotypique expliqués par chaque QTL (R^2) ainsi que l'effet additif des allèles induit par le parent femelle (TN1.11), nous avons utilisé la méthode du composite interval mapping (procédure Zmapqtl, model 6). Le seuil d'acceptation d'un QTL détecté après 1 000 permutations et un risque de 5% et un $\text{LOD} \geq 3$ (Churchill and Doerge, 1994). Les positions des QTL ont été estimées à l'emplacement du pic maximum du LOD score dans la région considérée. Un intervalle de confiance de part et d'autre du pic de chaque QTL a été estimé à $\text{LOD} - 1$ (Lander and Botstein, 1989). La représentation

graphique des groupes de liaisons et des positions des QTL a été faite par le logiciel MapChart, version 2.2 (Voorrips, 2002).

3. Résultats

3.1. Confirmation de la carte génétique

Nous avons pu confirmer que chaque marqueur par analyse de cartographie génétique a bien été affecté au groupe de liaison adéquat. La figure 25 montre clairement que tous les marqueurs sont liés les uns aux autres et que leur répartition est assez équitable sur l'ensemble des chromosomes (Fig. 26).

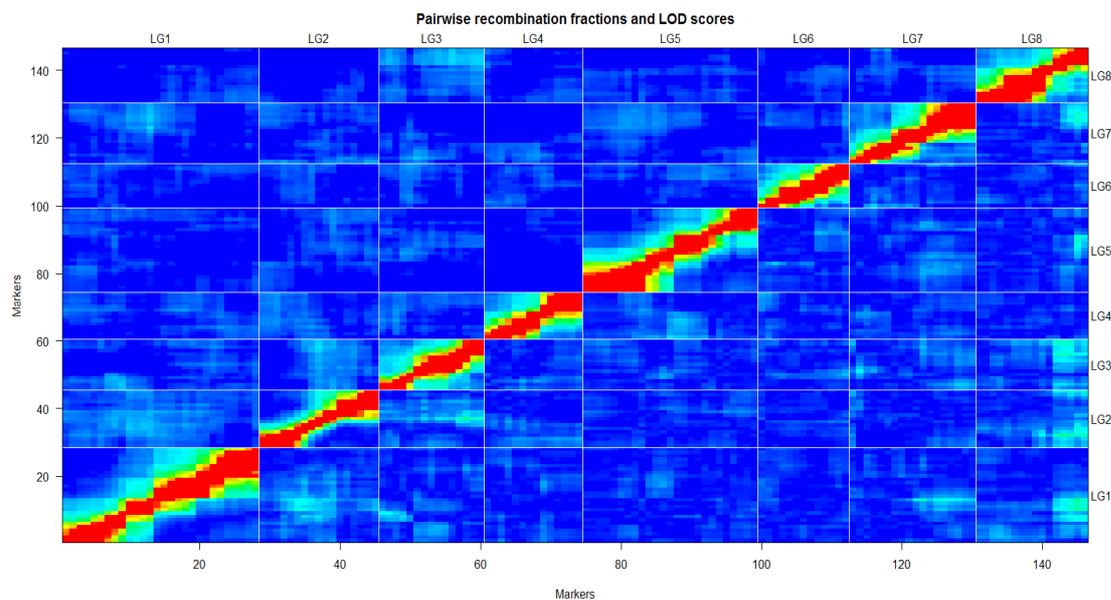


Fig. 25 Calcul des fractions de recombinaison (Partie supérieure : plus c'est bleu plus le taux de recombinaison est important entre les marqueurs, c.à.d. les marqueurs sont loin les uns des autres ; Partie inférieure : c'est la valeur du LOD score du test, qui compare les taux de recombinaison (haut du graphe) par rapport à un taux de 1/2, c.à.d. les marqueurs sont totalement indépendants ; En rouge : plus le Lod score est faible plus la coloration est rouge, tous les marqueurs sont liés de proche en proche).

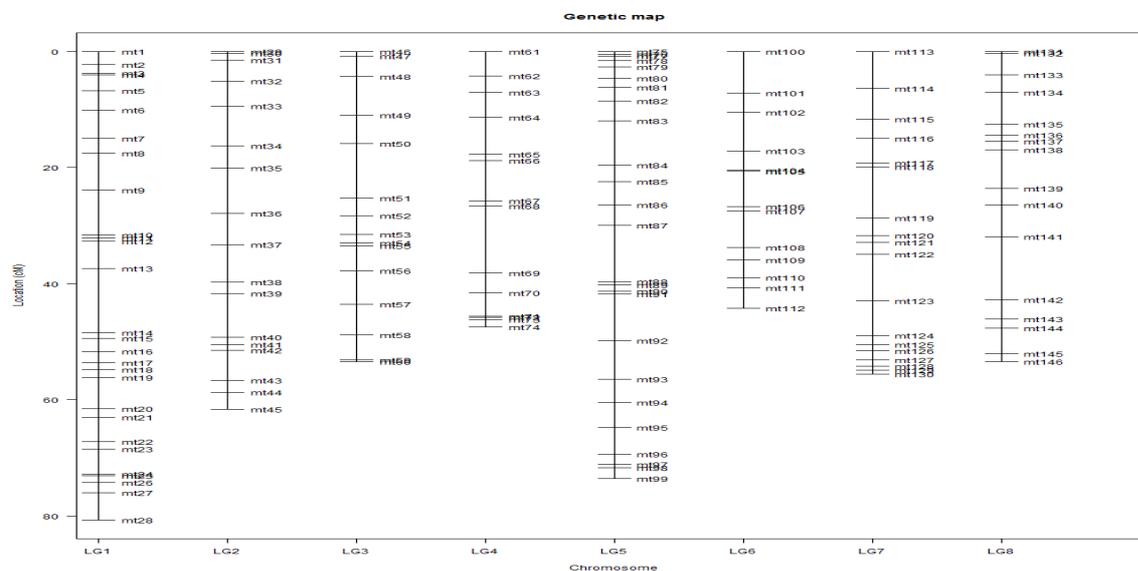


Fig. 26 : Visualisation de la répartition des marqueurs sur la carte génétique

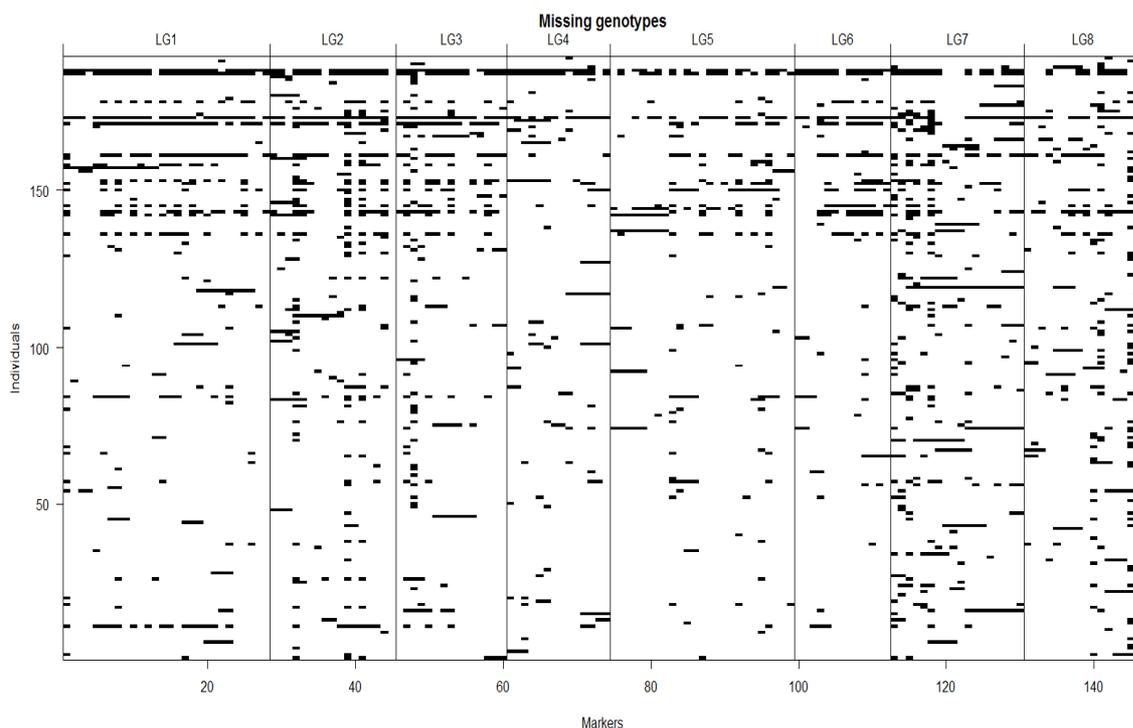


Fig. 27 : Représentation graphique des génotypes manquants dans la carte génétique

3.2. Analyse de variance et effet du stress sur les paramètres notés

3.2.1 Paramètres notés avant application du stress hydrique

3.2.1.1 Vigueur hivernale (WV)

L'analyse de variance a montré un effet lignée très hautement significatif pour la vigueur hivernale (WV) en 2013, mais n'a montré aucun effet en 2014 (Tab. 04) ; par contre, des différences significatives en 2014 ont été enregistrées entre les deux parents (Annexe 07). Les valeurs des lignées suivent une loi normale alors que les deux parents donnent des valeurs intermédiaires. L'héritabilité pour ce paramètre varie entre faible (0.19) en 2014 et moyenne (0.42) en 2013 (Annexe 07).

Tab. 04 : Analyse de variance (carrés moyens) pour la vigueur hivernale de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	0,529 NS	3,851 NS
Lignée	151	0,914 ***	1,222 NS
Erreur	174	0,366	1,058

NS : non significatif à $P > 0.05$, ***: significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.1.2 Vigueur printanière (SV)

Des différences significatives ont été révélées entre les lignées pour la vigueur printanière (SV) en 2013 (Tab. 05). Les deux parents ont donné des valeurs moyennes par rapport à celles enregistrées chez les lignées (Annexe 07). L'héritabilité pour ce caractère est considérée comme faible (Annexe 08).

Tab. 05 : Analyse de variance (carrés moyens) pour la vigueur printanière de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	1,914 NS	2,241 NS
Lignée	151	2.702 *	1,231 NS
Erreur	174	1,927	1,000

NS : non significatif à $P > 0.05$; * : significatif à $P < 0.05$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.1.3 Longueur du rameau principal (LB0)

Une importante variabilité a été observée entre les lignées pour la longueur du rameau principal avec un effet lignée très hautement significative en 2013 (Tab. 06). Des différences très hautement significatives (2013) et significatives (2014), entre les deux parents, ont aussi été signalées (Annexe 07). L'héritabilité pour ce paramètre varie entre faible (0.16) en 2014 et moyenne (0.49) en 2013 (Annexe 07).

Tab. 06 : Analyse de variance (carrés moyens) pour la longueur du rameau principal de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	18,25 NS	21,8 NS
Lignée	151	20.92 ***	9,57 NS
Erreur	174	7,660	7,060

NS : non significatif à $P > 0.05$; ***: significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.1.4 Nombre de ramifications primaires (NB)

L'analyse de variance n'a pas mis en évidence de différences significatives pour le nombre de ramifications (NB) entre les lignées durant les deux années d'essai (Tab. 07). Les deux parents se sont comportés de la même manière pour ce paramètre et ont donné des valeurs intermédiaires par rapport à leur descendance (Annexe 07). L'héritabilité calculée a donné des valeurs faibles (Annexe 07) variant entre 0.25 en 2013 et 0.17 en 2014.

Tab. 07 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre de ramifications de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	1,14 NS	6,341 NS
Lignée	151	1.808 NS	1,456 NS
Erreur	174	0,830	1,350

NS : non significatif à $P > 0.05$; *** : significatif à $P < 0.001$, respectivement ; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.1.5 Nombre d'entrenœuds (IN0)

L'analyse de variance a fait ressortir des différences très hautement significatives entre les lignées en 2013 (Tab. 08), alors que les deux parents (TN1.11, A17) ont donné des résultats sensiblement proches, mais qui restent moyens en comparaison avec ceux de la population de RILs (Annexe 07). L'héritabilité est faible en 2014 (0.23) et relativement moyenne en 2014 (0.34) (Annexe 07).

Tab. 08 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre d'entrenœuds de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	2,144 NS	7.234 *
Lignée	151	1,808 NS	1,456 NS
Erreur	174	1,261	1,108

NS : non significatif à $P > 0.05$; * : significatif à $P < 0.05$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.1.6 Envergure (SP)

L'envergure a été notée en une seule année (2013) et a donné des différences hautement significatives entre les lignées (Tab. 09) et une différence significative entre leurs parents. L'héritabilité, pour l'envergure, est de 0.57 (Annexe 07).

Tab. 09 : Analyse de variance (carrés moyens) pour l'envergure de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	34,2 NS	-
Lignée	151	44.9 **	-
Erreur	174	28,100	-

NS : non significatif à $P > 0.05$; ** : significatif à $P < 0.01$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.1.7 Date de floraison (FD)

Des différences très hautement significatives ont été révélées par l'analyse de variance entre les lignées durant les deux années d'expérience (Tab. 10). Les deux parents ont aussi des dates de floraison significativement différentes (Annexe 07), mais qui restent moyennes par rapport à leurs descendances. L'héritabilité, pour la date de floraison, est relativement moyenne à élevée (Annexe 07) avec des valeurs entre 0.34 (2013) et 0.66 (2014).

Tab. 10 : Analyse de variance (carrés moyens) pour la date de floraison de la population RILs de *M. truncatula* en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Bloc	13	46,9 NS	78,33 NS
Lignée	151	61.7 ***	73.12 ***
Erreur	174	17,800	14,990

NS : non significatif à $P > 0.05$; *** : significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.2 Paramètres après application du stress hydrique

L'analyse de l'effet du déficit hydrique sur les paramètres de fitness montre qu'il existe une grande variabilité génétique au sein de la population de RILs.

3.2.2.1 Nombre de graines par gousse (MSN)

L'analyse de variance montre un effet traitement très hautement significatif (Tab. 11) pour ce paramètre (2013-2014). L'effet du stress hydrique appliqué a été hautement significatif durant les deux années d'essai (Tab.11) et a causé une diminution du nombre de graines de plus de 17% (Annexe 9).

Tab. 11 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre de graines par gousse de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014.

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	352.7 ***	643.45 ***
Lignée	151	2.5 **	2.21 ***
Traitement*Lignée	150	1,6 NS	1.14 NS
Erreur	173	1,60	0.92

NS : non significatif à $P > 0.05$; ** et *** : significatif à $P < 0.01$ et $P < 0.001$, respectivement. DL : nombre de degrés de liberté

La comparaison entre les deux parents (Annexe 08) que se soit en condition de stress ou bien en condition de control ne montre pas des différences importantes pour ce paramètre par contre les lignées recombinantes montrent une grande variabilité avec des valeurs qui dépassent celles des deux parents (Annexe 9).

3.2.2.2 Nombre de gousses par plante (TPN)

L'analyse de l'effet du stress hydrique sur le nombre de gousses par plante montre une grande variabilité génotypique pour ce paramètre (Tab. 12). L'effet stress a été très hautement significatif durant les deux années d'essai et a engendré une réduction de plus de 34% pour ce paramètre (Annexe 9). Une forte ségrégation transgressive a aussi été observée pour la population RILs par rapport aux deux parents qui ont donnés des valeurs moyennes (Annexe 8). L'héritabilité pour ce paramètre est comprise entre 0.35 et 0.42 (Annexe 9).

Ta. 12 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le nombre de gousses par plante de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	58045 ***	130750 ***
Lignée	151	684 ***	426 ***
Traitement*Lignée	150	175 ^{NS}	206 ^{NS}
Erreur	173	218	162,00

NS : non significatif à $P > 0.05$; *** : significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.2.3 Poids total des gousses par plante (TPW)

Des différences hautement significatives ont été enregistrées entre les deux parents pour ce paramètre que ce soit en situation de stress hydrique ou bien en situation non stressée (Annexe 8). La comparaison entre les différentes lignées a fait ressortir un effet très hautement significatif (2013, 2014) démontrant une importante variabilité (Tab. 13). L'application du stress hydrique a fait ressortir aussi un effet très hautement significatif (Tab. 13) et a engendré une diminution du poids total des gousses de plus de 40% (Annexe 9). L'héritabilité, pour ce paramètre, est comprise entre 0.16 et 0.28 (Annexe 9).

Tab. 13 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids total des gousses par plante de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	1668.7***	5449 ***
Lignée	151	13.9 ***	5 ***
Traitement*Lignée	150	4,20 NS	3,00 NS
Erreur	173	5,50	3,00

NS : non significatif à $P > 0.05$; *** : significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.2.4 Poids total des graines par gousse (TWSP)

L'effet du traitement hydrique a été très hautement significatif pour ce paramètre (Tab.14) mais la réduction en poids total des graines n'a pas été très importante (5%) (Annexe 9). De même pour l'effet ligné où on a enregistré des différences très hautement significatives (Tab. 14). L'héritabilité est comprise entre 0.15 et 0.17 respectivement en situation de stress et en irriguée (Annexe 9).

Tab. 14 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids total des graines par gousse de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	-	19047.4 ***
Lignée	151	-	67.5 ***
Traitement*Lignée	150	-	25.7 ^{NS}
Erreur	173	-	37.2

NS : non significatif à $P > 0.05$; *** : significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.2.5 Poids moyen des gousses (MPW)

Les résultats obtenus montrent que l'application du stress hydrique a eu une influence sur le poids moyen des gousses avec des réductions qui peuvent aller jusqu'à 12% (Annexe 9). La comparaison entre les deux parents (TN1.11 et A17) montre des différences hautement significatives pour ce caractère dans les deux conditions et pour les deux années (Annexe 8). Le calcul de l'héritabilité a donné des valeurs moyennes qui varient entre 0.31 et 0.53 (Annexe 9).

L'analyse de variance a révélé des différences très hautement significatives entre les lignées et entre les deux traitements hydriques appliqués (Tab. 15).

Tab. 15 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids moyen des gousses de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	0.019 ***	0.227 ***
Lignée	151	0.0017***	0.001 ***
Traitement*Lignée	150	0,0005 NS	0.0004 NS
Erreur	173	0,0005	0.0004

NS : non significatif à $P = 0.05$; ** et *** : significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.2.6 Poids moyen des graines (MSW)

Le poids moyen des graines a été fortement influencé par l'application du stress hydrique. Les plantes en situation de stress hydrique ont produit des graines de poids plus faible avec une réduction avoisinant les 25% (Annexe 9). La comparaison entre les deux parents, en situation de stress comme en situation irriguée, fait ressortir des différences très hautement significatives (Annexe 8). L'héritabilité pour ce caractère varie entre 0.23 et 0.45 (Annexe 9). L'effet traitement a été très hautement significatif durant 2013 et 2014, alors que l'effet lignée n'a été significatif que durant l'essai de 2014 (Tab. 16).

Tab. 16 : Analyse de variance (carrés moyens) pour le poids moyen des graines de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	9.6835 ***	78.64 ***
Lignée	151	0.4223 ***	0,54 ^{NS}
Traitement*Lignée	150	0.1357 ^{NS}	0.52 ***
Erreur	173	0.2007	0,2800

NS : non significatif à $P > 0.05$; *** : significatif à $P < 0.001$; DL : nombre de degrés de liberté

3.2.2.7 Longueur du rameau principal en fin de cycle (LB3)

L'application du stress hydrique a eu un effet très hautement significatif sur la longueur du rameau principal (Tab. 17). Une très grande variabilité a été enregistrée en présence et en absence de stress hydrique sur les différentes lignées (Tab. 17). Des différences significatives ont été notées entre les deux parents en condition non stressée, mais les disparités s'amenuisent en condition de stress hydrique (Annexe 9).

Tab. 17 : Analyse de variance (carrés moyens) pour la longueur du rameau principal en fin de cycle de la population RILs de *M. truncatula* sous deux contraintes hydriques en 2013 et 2014

Effet	DL	Carrés moyens	
		Année 2013	Année 2014
Traitement	1	1422.2 ***	5307.5 ***
Lignée	151	98.6 ***	94.1 ***
Traitement*Lignée	150	45.5 *	39.7 ^{NS}
Erreur	173	34,5000	38.7

NS : non significatif à $P = 0.05$; * et *** : significatif à $P < 0.05$ et $P < 0.001$, respectivement ; DL : nombre de degrés de liberté

3.3 Analyses de corrélations

3.3.1 Caractères avant application du stress hydrique

Pour les deux années d'essai, les caractères notés avant l'application du stress hydrique sont très hautement corrélés entre eux (Fig. 28, 29). Les corrélations sont toutes positives à l'exception de la date de floraison qui est corrélée négativement avec l'ensemble des caractères étudiés. Cela indique que les lignées les plus précoces sont celles qui sont les plus développées.

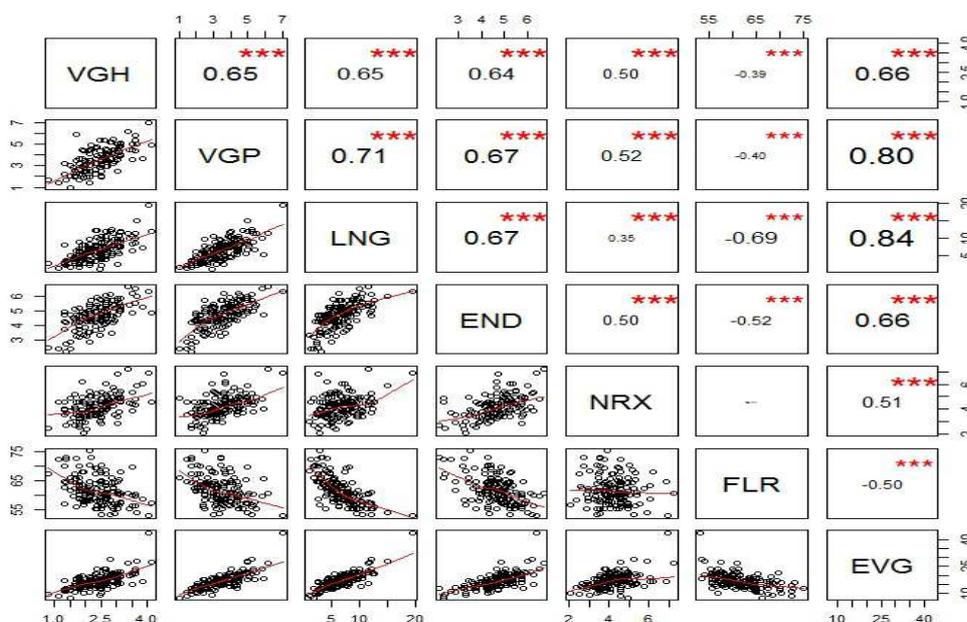


Fig. 28 : Matrice des corrélations pour les différents caractères avant stress en 2013

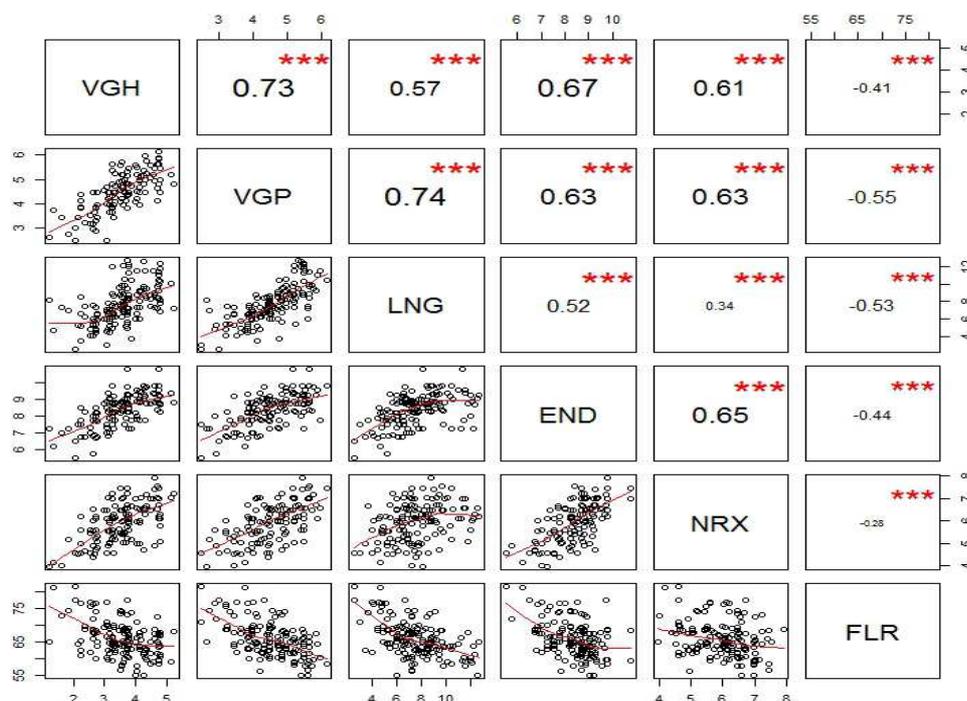


Fig. 29 : Matrice des corrélations pour les différents caractères avant stress en 2014

3.3.2 Caractères après application du stress hydrique

Que ce soit en condition de contrôle ou en condition de stress hydrique (Fig. 30, 31, 32 et 33), nous avons obtenu des corrélations très hautement significatives entre le poids total des gousses et le nombre total de gousses durant les deux années d'expérimentation. Alors que la corrélation est négative entre le nombre de graines par gousse et le poids moyen des gousses ; le poids total des graines par gousse a donné des corrélations fortes et positives avec le nombre de graines par gousse, le poids moyen des graines et le poids moyen des gousses ; alors que la corrélation a été négative avec le nombre total des gousses par plante. Ce qui implique que plus la plante produit de gousses et plus le poids total des gousses par plante est élevé. Par contre, le poids moyen des gousses et le poids total des graines par gousse diminuent sensiblement.

L'analyse des corrélations entre la situation de contrôle et la situation de stress hydrique, pour les différents paramètres, a révélé des corrélations positives, significatives à très hautement significatives durant les deux années d'expérimentation, à l'exception du poids moyen des graines en 2013 (Annexe 11). L'importance de ces corrélations tient au fait qu'elles permettent de prédire la réaction de ces lignées en condition de stress hydrique à partir de leurs comportements en condition de contrôle.

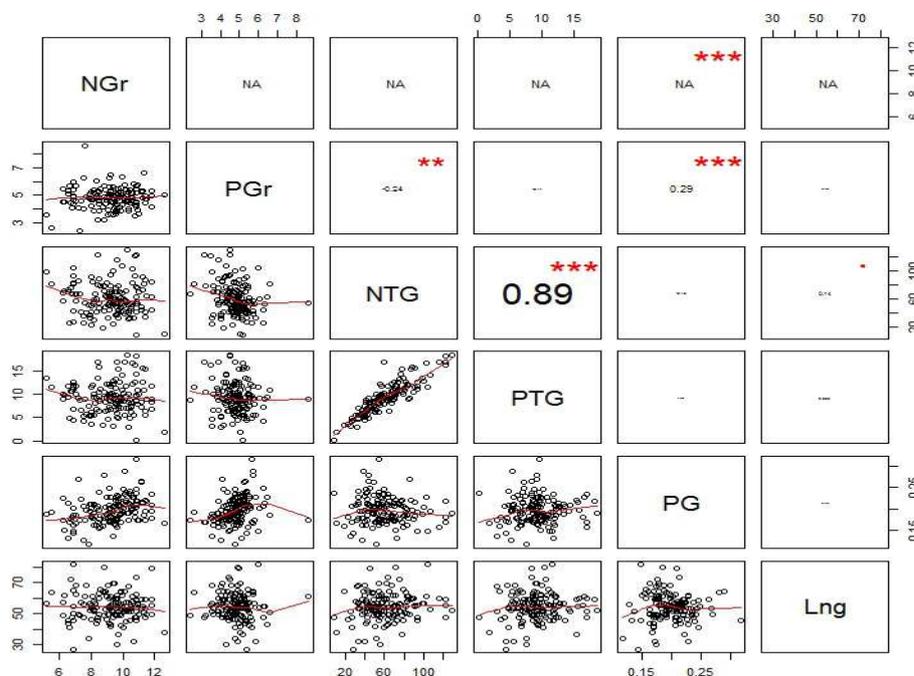


Fig. 30 : Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en irrigué (2013)

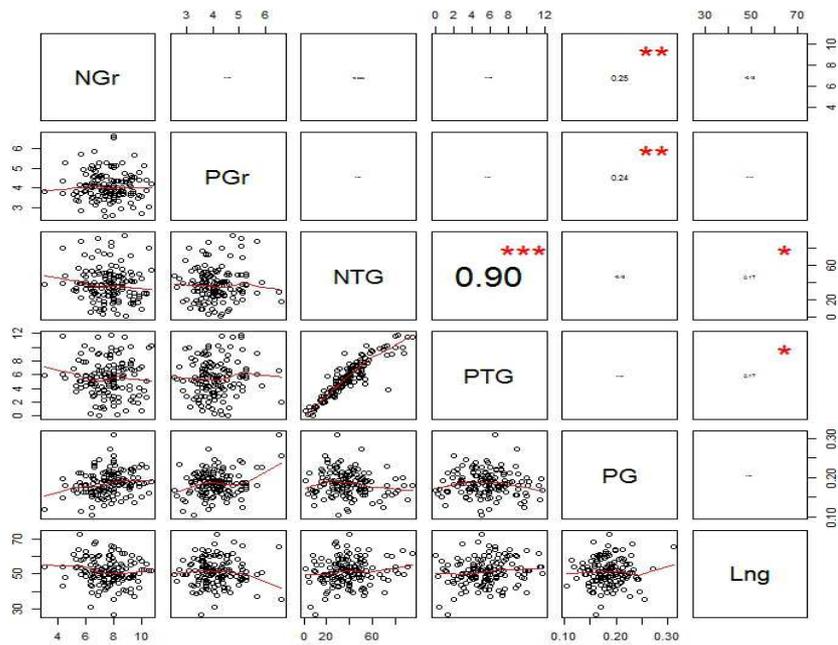


Fig. 31 : Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en stressé (2013)

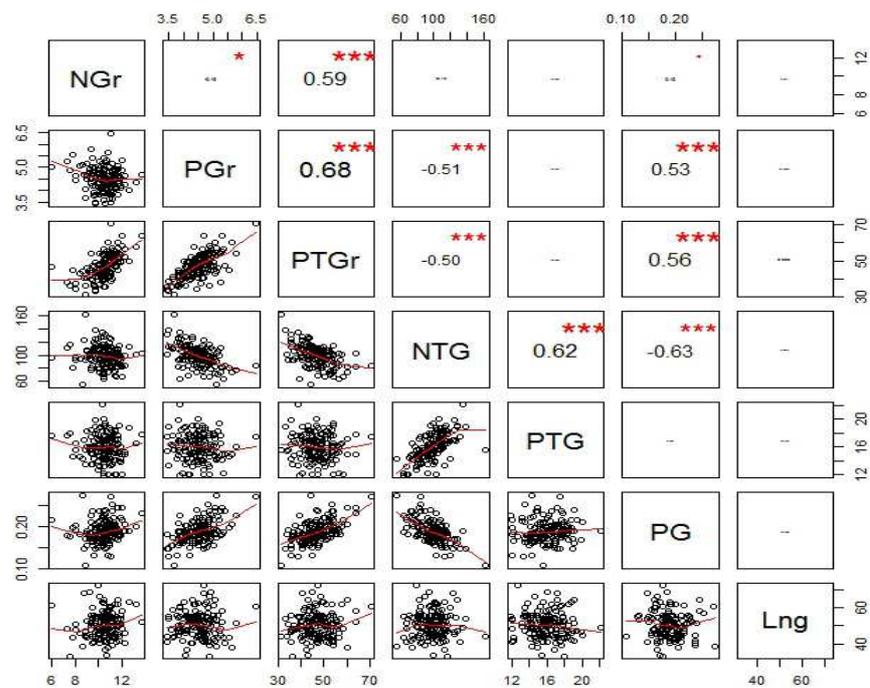


Fig. 32 : Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en irrigué (2014)

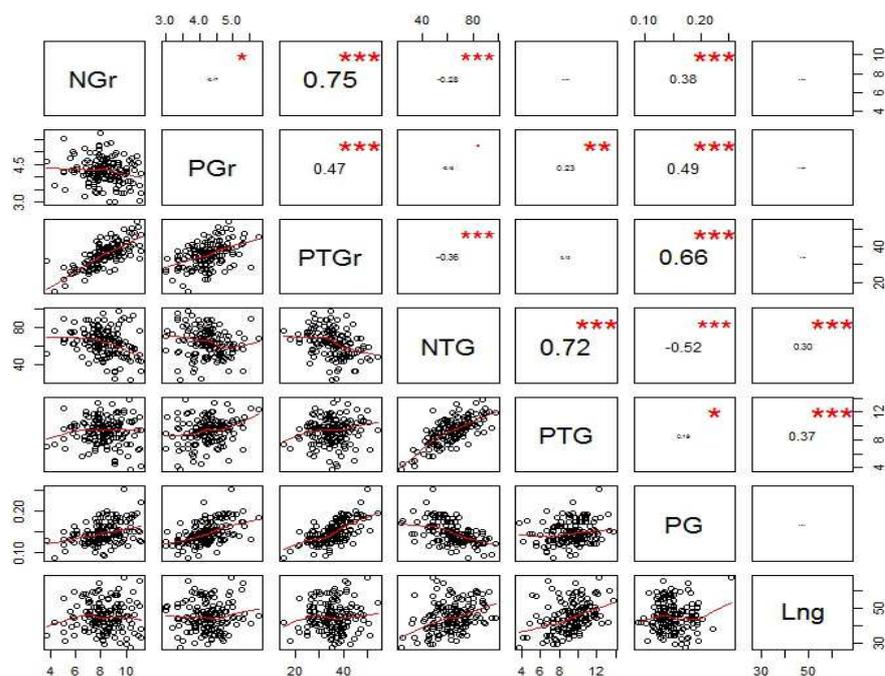


Fig. 33 : Matrice des corrélations pour les différents caractères de fitness en stressé (2014)

3.4 Localisation et identification des QTL

La forte variabilité génétique observée pour les caractères étudiés que ce soit avant ou après l'application du stress hydrique, nous a conduit à identifier plusieurs régions génomiques impliquées dans cette variabilité génétique (Annexe 12). Au total 49 QTL ont été trouvés dans cette étude, dont 6 pour les paramètres relevés jusqu'au stade début floraison et 43 QTL pour les caractères relevés après le stade début floraison (application ou non d'un stress hydrique), ceci durant les deux années d'expérimentation. Au total 17 QTL ont été trouvés en condition stressée et 26 QTL en condition de contrôle. Un à trois QTL ont été mis en évidence pour chaque paramètre en fonction de l'année d'expérimentation et de la condition hydrique appliquée aux lignées. À l'exception du chromosome 6, des QTL ont été trouvés sur chaque chromosome, avec un effet des allèles parfois positif, parfois négatif. Le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL se situe entre 6% et 38%. Le nombre le plus élevé de QTL a été trouvé sur le chromosome 7 avec 16 QTL, suivi des chromosomes 2 et 4 avec 8 QTL. Trois QTL sont trouvés sur le chromosome 3, six QTL sur le chromosome 1 et deux QTL sur les chromosomes 5 et 8 chacun. Le nombre de QTL trouvés en fonction des années est presque égal avec 25 QTL en 2013 et 24 QTL en 2014.

Le chromosome 7 rassemble des QTL représentant des caractères notés dans différentes conditions et qui sont co-localisés : il regroupe des QTL relatifs à des caractères notés avant le début d'application du stress hydrique : date de floraison (FD), longueur du rameau principal et

vigueur printanière, ainsi que des QTL représentant des caractères prélevés après l'application du stress hydrique : en condition stressée (poids moyen des graines, poids total des gousses, poids moyen des gousses) ou bien en condition de contrôle (poids total des gousses, la longueur du rameau principale, poids moyen des gousses). Le LOD score le plus élevé (21.7) a été trouvé sur ce chromosome pour la date de floraison, avec une variance phénotypique expliquée de 38%.

Plusieurs QTL sont co-localisés aussi sur les autres chromosomes comme c'est le cas pour le chromosome 1 entre 70 et 81 cM, le chromosome 2 entre 15 et 45 cM, le chromosome 3 entre 28 et 42 cM, le chromosome 4 entre 0 et 10.5 et le chromosome 5 entre 30 et 45 cM.

3.4.1 Paramètres avant application du stress hydrique

Pour les caractères vigueur printanière (SV) et longueur du rameau principal (LB0) nous avons pu mettre en évidence un QTL pour chacun d'eux (2013), positionnés sur le chromosome 7, avec un LOD score de 3.1 et 8 respectivement (Tab. 18). La recherche de QTL de date de début floraison (FD) a permis de détecter quatre endroits différents sur le génome de *M. truncatula*. Deux QTL ont été trouvés sur le chromosome 7 (Fig. 34, 35) avec un effet additif positif et avec des LOD score de l'ordre de 7.9 et 21.7 en 2013 et 2014, respectivement. Deux autres QTL ont été trouvés sur le chromosome 4 et sur le chromosome 1 avec un effet d'additivité négatif et des LOD de 5.6 et 3.5, respectivement (Tab. 18).

Tab. 18 : QTL de caractères notés avant l'application du stress hydrique

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif De l'allèle de TN1.11	R ²
SV	2013	7	mt119	30.71	24-32.5	3.1	-0.33	8.77
FD	2013	4	mt69	40.21	35-42	5.6	-1.34	8.02
FD	2013	7	mt126	51.61	51-52	21.7	3.12	38.02
FD	2014	1	mt19	58.21	56-67	3.5	-1.44	7.34
FD	2014	7	mt122	42.91	39-43	7.9	2.43	19.34
LB0	2013	7	mt126	51.61	50-52.5	8.0	-1.41	18.38

La variance phénotypique, expliquée par ces QTL, varie entre 8 et 38% (Tab. 18). Aucun QTL n'a été trouvé pour les paramètres vigueur hivernale (2013), nombre d'entre-nœuds (2013) et l'envergure des plantes (2013). Il est important de signaler qu'aucune recherche de QTL n'a été faite pour les caractères n'ayant pas d'effet lignée significatif.

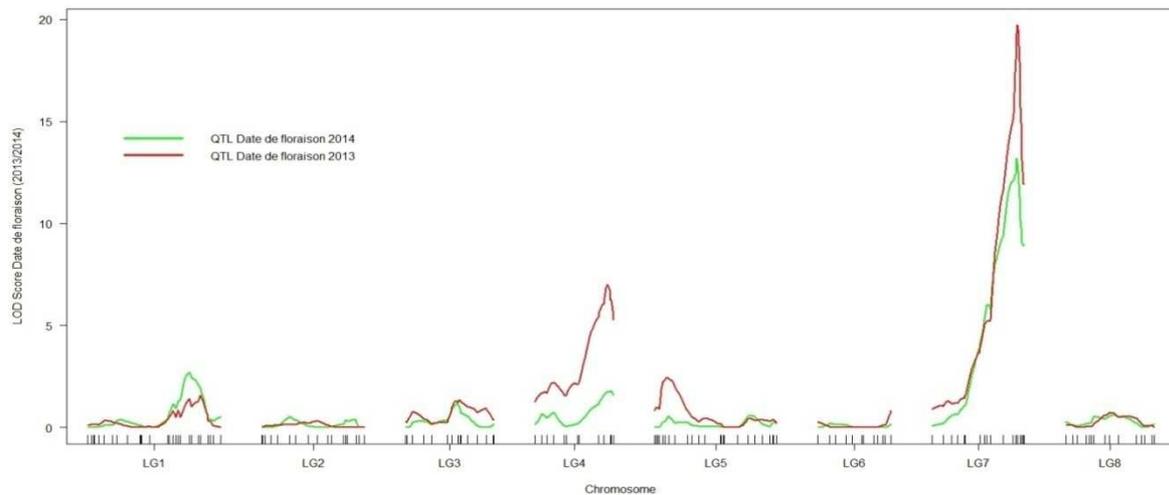


Fig. 34 : LOD score pour la date de floraison sur les différents chromosomes pour les deux années d'expérimentation

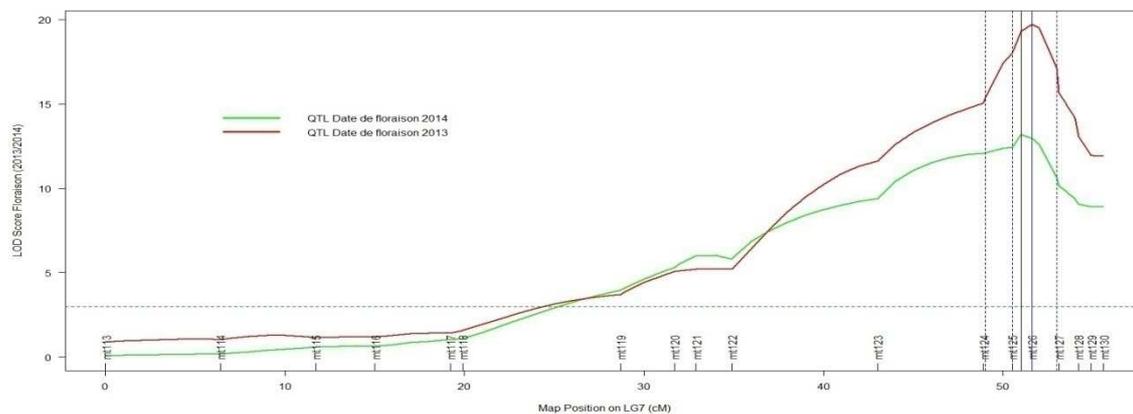


Fig. 35 : QTL de la date de floraison sur le chromosome 7 pour les deux années d'expérimentation (2013 et 2014)

3.4.2 Paramètres après application du stress hydrique

3.4.2.1 Nombre de graines par gousse (MSN)

Au total 6 QTL ont été identifiés pour ce paramètre, dont cinq en 2013 et un seul QTL en 2014 (Tab. 19 ; Fig. 36). Quatre QTL ont été détectés en condition non stressée et deux en condition de stress hydrique. Le QTL situé près du marqueur mt27 sur le chromosome 1 (en contrôle) a été retrouvé exactement au même endroit durant les deux années d'expérimentation (Annexe 12). Alors que les autres QTL ont été trouvés sur les chromosomes 2, 4 et 5 indépendamment de la contrainte hydrique appliquée. Cependant, le QTL qui se situe entre l'intervalle 30-46 cM (Annexe 12) semble indifférent à la contrainte appliquée et représente un QTL commun aux deux conditions hydriques. Les LOD scores, pour ce caractère, sont compris entre 3 et 4 alors que la variance phénotypique expliquée par chaque QTL est comprise entre 7.7 et 10.7 (Tab. 19).

Tab. 19 : QTL détectés pour le nombre de graines par gousse en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif De l'allèle de TN1.11	R ²
MSNw	2013	1	mt27	76.01	73.5-78	3.3	-0.42	7.7
MSNw	2013	2	mt34	18.31	15-24	4.2	-0.51	10.69
MSNw	2013	5	mt87	34.01	30-39	3.3	-0.47	9.65
MSNw	2014	1	mt27	76.01	73.5-79	4.0	-0.35	9.85
MSNs	2013	4	mt71	45.61	43-46	2.9	0.43	7.27
MSNs	2013	5	mt91	41.81	34-45.5	3.1	-0.41	7.96

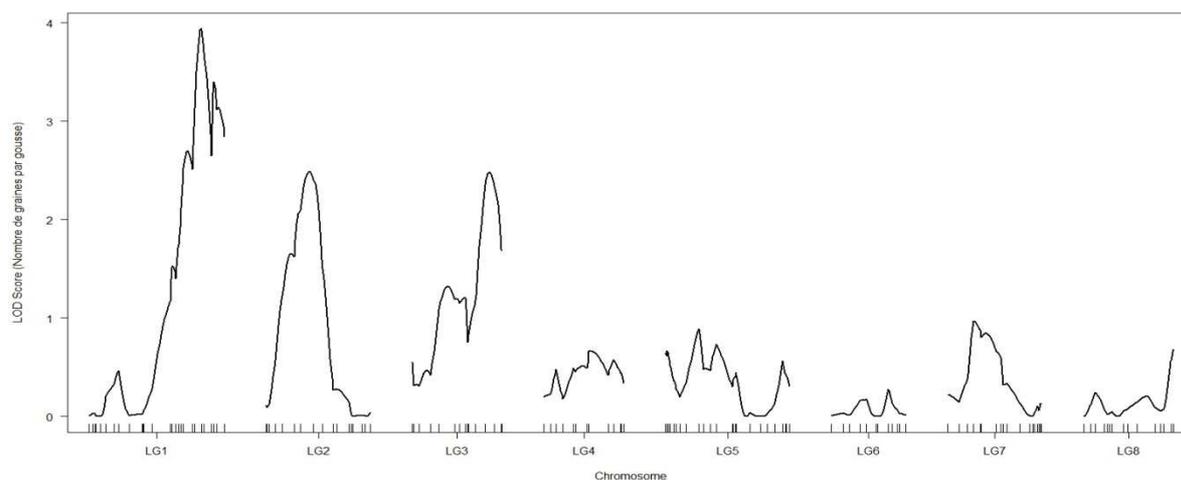


Fig. 36 : LOD score pour le nombre de graines par gousse en condition irriguée (2014)

3.4.2.2 Nombre total de gousses par plante (TPN)

La recherche de QTL pour ce paramètre nous a permis d'identifier 7 QTL, dont 4 sur le chromosome 7, deux sur le chromosome 3 et un QTL sur le chromosome 2 (Tab. 20). Un QTL proche du marqueur mt 126 sur le chromosome 7 (Fig. 37, Annexe 12) et commun aux deux conditions d'étude a été retrouvé en condition contrôle (2013 et 2014) et en condition stressée (2013) exactement sur la même position. La variance phénotypique expliquée par ces QTL est comprise entre 7 et 24%, alors que les LOD score sont entre 3.3 et 11.7 (Tab. 20).

Tab. 20 : QTL détectés pour le nombre total de gousses par plante en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif de l'allèle de TN1.11	R ²
TPNw	2013	3	mt46	0.01	00-03	4.0	-7.01	7.63
TPNw	2013	3	mt52	30.31	28-33	5.5	7.97	11.08
TPNw	2013	7	mt126	51.61	48-53	11.7	12.30	24.89
TPNw	2014	7	mt114	06.41	1.2-8.9	3.3	4.56	7.33
TPNw	2014	7	mt125	50.51	47-56	3.5	4.91	7.57
TPNs	2013	7	mt126	51.61	51-53	9.5	10.14	22.13
TPNs	2014	2	mt43	56.61	53.5-61	3.3	-4.35	8.41

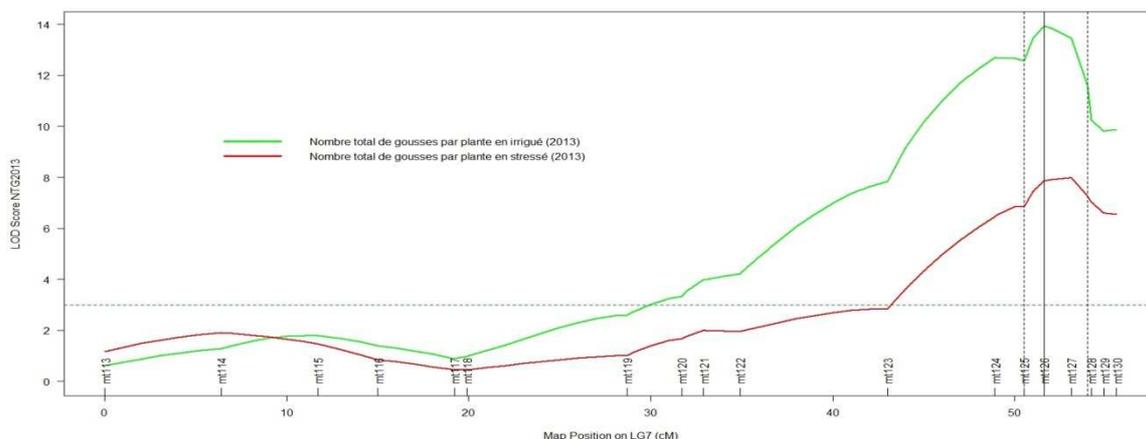


Fig. 37 : LOD Score pour le nombre total de gousses par plante en stressé et en irrigué (2013)

3.4.2.3 Poids total des gousses par plante (TPW)

Cinq QTL ont été identifiés pour le poids total des gousses et 3 chromosomes ont été impliqués (chromosomes 3,7 et 8). Trois QTL sont situés sur le chromosome 7 (Fig. 38), dont deux se localisent sur le même locus (mt127) et représentent deux situations hydriques différentes (2013) (Annexe 12). Les LOD scores observés sont compris entre 3 et 8.4 et la variance phénotypique expliquée est comprise entre 6 et 19 (Tab. 21).

Tab. 21 : QTL détectés pour le poids total des gousses par plante en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif de l'allèle de TN1.11	R ²
TPWw	2013	3	mt53	31.51	28.5-33	3.9	1.04	8.73
TPWw	2013	7	mt127	53.11	47-54	4.9	1.21	11.12
TPWw	2014	7	mt113	6.01	01-09	4.6	0.69	13.3
TPWs	2013	7	mt126	51.61	48-53	8.4	1.23	18.83
TPWs	2013	8	mt134	9.11	06-14	3.0	0.67	6.34

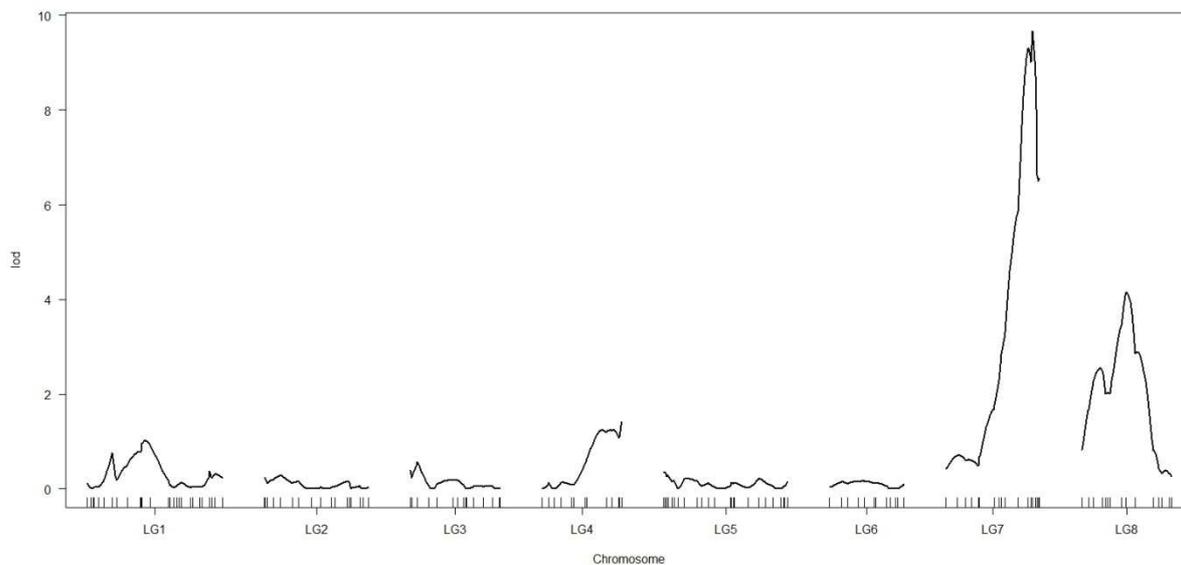


Fig. 38 : LOD score pour le poids total des gousses par plante en condition stressée (2013)

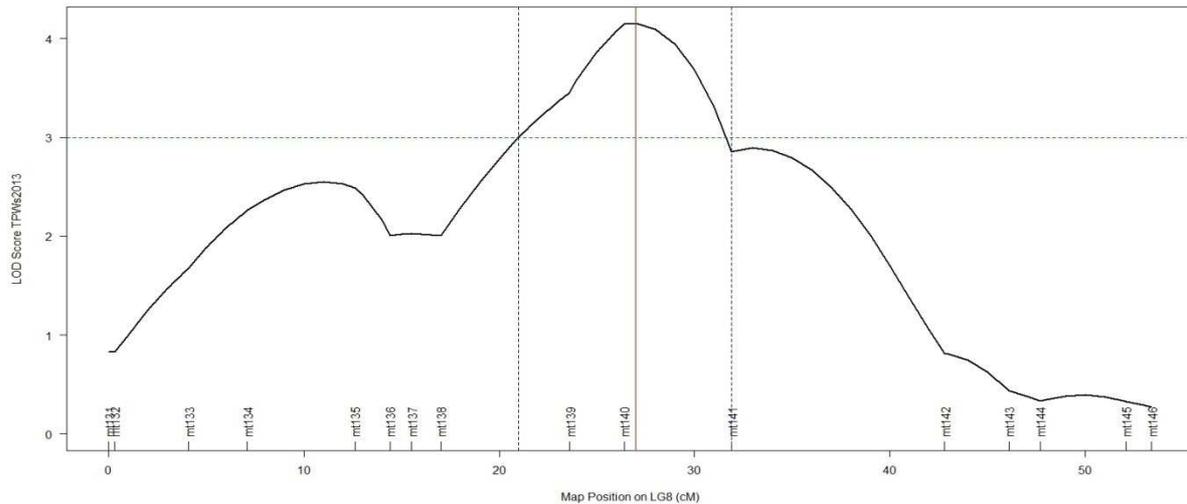


Fig. 39 : LOD Score pour le poids total des gousses par plante en condition stressée sur le chromosome 8 (2013)

3.4.2.4 Poids total des graines par gousse (TWSP)

Les QTL relatifs au poids total des graines par gousse ont été mis en évidence sur quatre chromosomes différents (chromosomes 2, 3, 4 et 7). Trois QTL sont représentatifs de la condition irriguée et deux QTL pour la condition stressée. Parmi ces QTL, deux se co-localisent sur le même chromosome 4 (Fig. 40) et sont représentatifs des deux conditions hydriques. La variance phénotypique expliquée par ces QTL varie de 6 à 13.5%, alors que les LOD score sont compris entre 3 et 5.5 (Tab. 22).

Tab. 22 : QTL détectés pour le poids total des graines par gousse en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif de l'allèle de TN1.11	R ²
TWSPw	2014	3	mt57	43.51	34-49	3.0	-1.72	6.02
TWSPw	2014	4	mt63	7.11	6-10.5	3.8	1.93	8.26
TWSPw	2014	7	mt127	53.11	44-56	4.2	-2.18	8.9
TWSPs	2014	2	mt37	33.31	32-36.5	2.9	2.17	7.19
TWSPs	2014	4	mt62	6.21	3.8-08	5.5	2.55	13.56

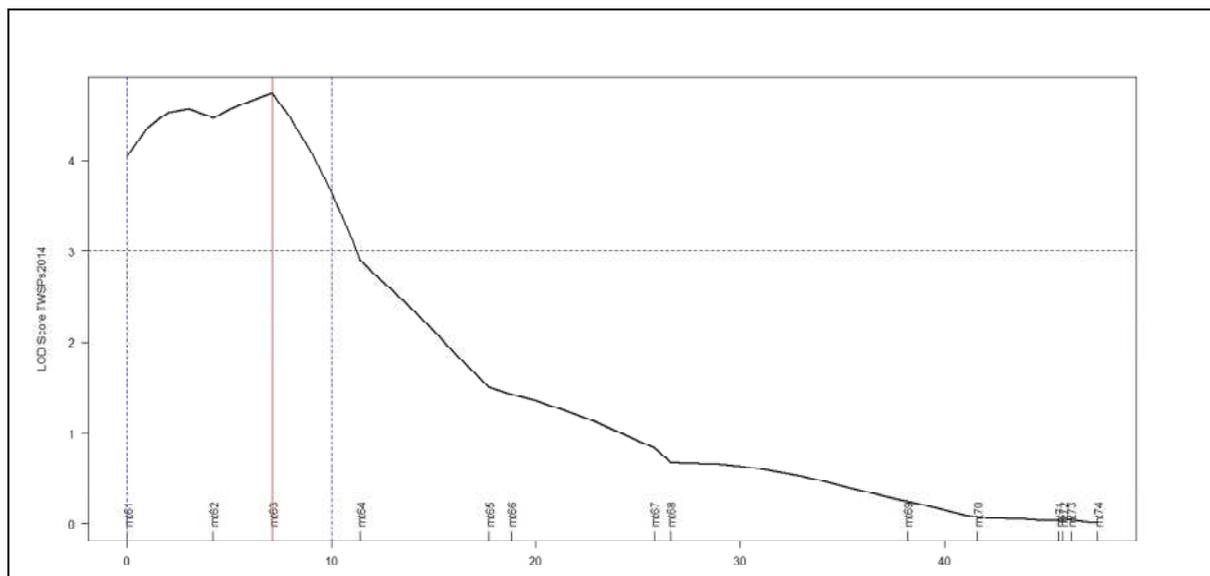


Fig. 40 : LOD Score pour le poids total des graines par gousse en condition irriguée (2014) sur le chromosome 4

3.4.2.5 Poids moyen des gousses (MPW)

Les de QTL détectés, et impliqués dans l’expression de ce caractère, sont au nombre de 7 (Tab. 23) répartis sur 5 chromosomes (chromosomes 2, 3, 4, 7 et 8) (Fig. 41). Quatre QTL ont été trouvés en 2013 et trois QTL en 2014. Quatre d’entre eux ont été trouvés en condition de contrôle et trois en condition de stress hydrique. Deux QTL se co-localisent sur le chromosome 3 dans l’intervalle 34-41 cM (Annexe 12) et représentent les deux conditions de stress testées. Les valeurs de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL sont comprises entre 6 et 15, alors que les LOD scores sont entre 2.9 et 6.3 (Tab. 23).

Tab. 23 : QTL détectés pour le poids moyen des gousses en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif de l’allèle de TN1.11	R ²
MPW _w	2013	7	mt129	54.91	52-57	2.9	-0.01	6.69
MPW _w	2013	8	mt141	41.91	37-44.8	3.5	0.01	8.59
MPW _w	2014	2	mt44	60.71	59-62	4.6	0.01	10.09
MPW _w	2014	3	mt56	37.81	34-40.5	2.9	-0.01	5.9
MPW _s	2013	2	mt41	50.51	47-54	3.9	0.01	9.32
MPW _s	2013	3	mt55	37.51	34-41.5	4.2	-0.01	10.37
MPW _s	2014	4	mt62	6.21	5-10	6.3	0.01	15.02

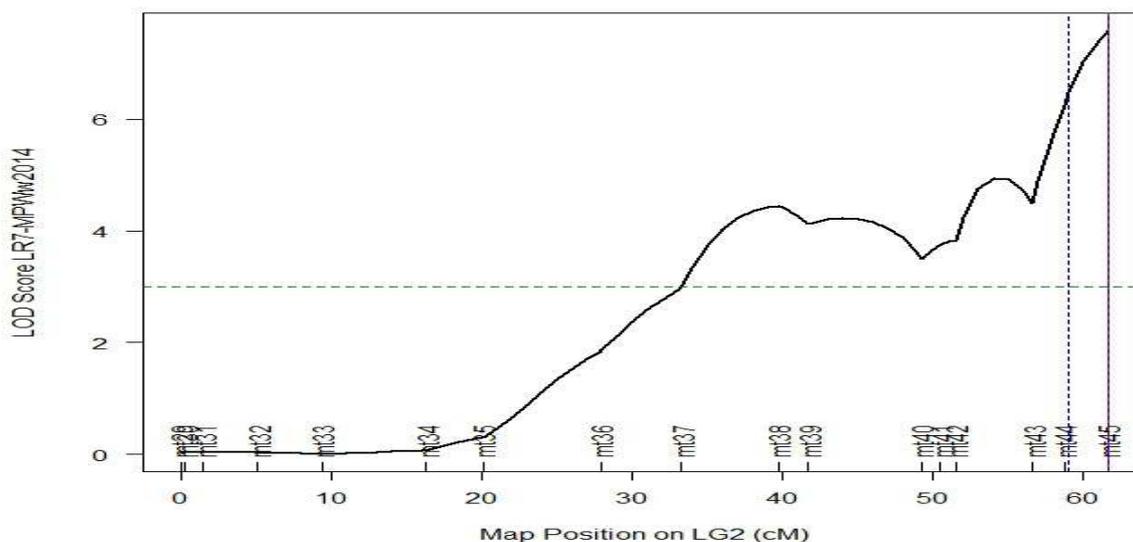


Fig. 41 : LOD Score pour le poids moyen des gousses en condition irriguée (2014) sur le chromosome 2

3.4.2.6 Poids moyen des graines (MSW)

L'analyse QTL pour ce paramètre a été faite juste pour l'année 2014, étant donné qu'en 2013 l'effet lignée n'a pas été significatif. Les résultats obtenus ont fait ressortir six QTL, trois d'entre eux en condition de stress et les trois autres en condition non stressée (Tab. 24 ; Fig. 42). Sur l'intervalle 1-10.5 cM du chromosome 4 (Annexe 12), deux QTL, représentant chacun une condition hydrique, se co-localisent ; de même pour le chromosome 7, sur la région chromosomique 45-50 cM (Tab. 24, Annexe 12). Les LOD score sont compris entre 3 et 7 et la variance phénotypique expliquée par chaque QTL est comprise entre 6 et 14.7 (Tab. 24).

Tab. 24 : QTL détectés pour le poids moyen des graines en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif de l'allèle de TN1.11	R ²
MSWw	2014	2	mt44	60.71	59-62	3.0	0.13	6.1
MSWw	2014	4	mt63	7.11	4-10.5	4.5	0.15	9.08
MSWw	2014	7	mt124	48.91	47.5-50	7.0	-0.20	14.36
MSWS	2014	4	mt62	6.21	01-08	5.5	0.18	11.01
MSWS	2014	4	mt68	28.61	26-34	2.9	-0.14	6.54
MSWS	2014	7	mt123	47.01	45-50	6.7	-0.21	14.73

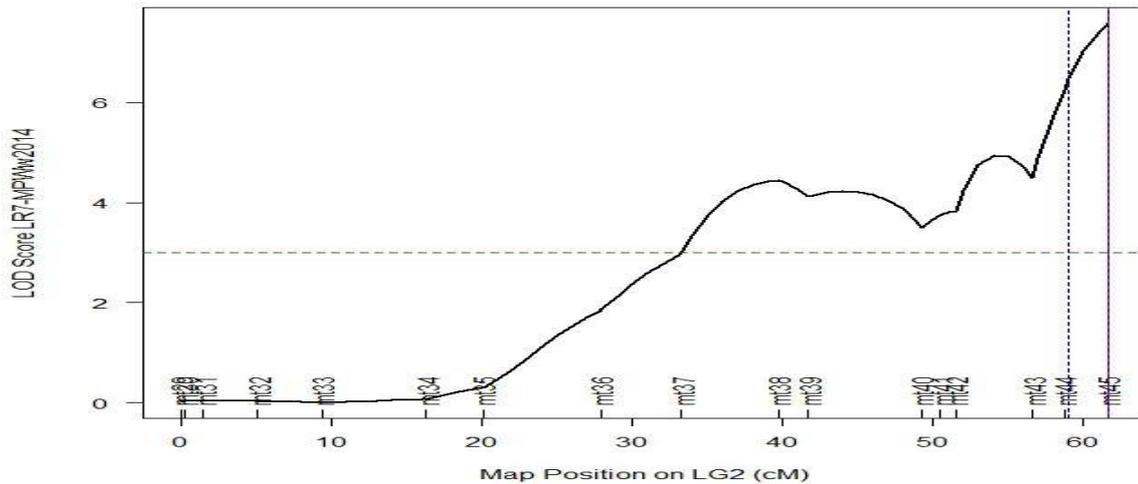


Fig. 42 : LOD Score pour le poids moyen des graines par gousse en condition irriguée (2014)

3.4.2.7 Longueur du rameau principal en fin de cycle (LB3)

La longueur du rameau principal semble être influencée par plusieurs QTL que l'analyse QTL a mis en évidence. Sept QTL ont été découverts, dont quatre en condition contrôle et trois en condition de stress hydrique (Tab. 25). Quatre chromosomes sont concernés (chromosome 1, 2, 3 et 7). En condition de stress hydrique, un QTL a été trouvé sur le chromosome 2 (34 à 45 cM) durant les deux années d'expérimentation (Fig. 43, Annexe 12). Les LOD scores sont compris entre 2.8 et 5.3 alors que la variance phénotypique expliquée est comprise entre 6.5 et 13 (Tab. 25).

Tab. 25 : QTL détectés pour la longueur du rameau principal en fin de cycle en condition irriguée et en condition stressée (2013-2014)

Caractère	Année	chromosome	Marqueur	Position QTL et intervalle de confiance (cM)		LOD	Effet additif de l'allèle de TN1.11	R ²
LB3w	2013	1	mt24	72.81	70 -73.5	4.0	2.90	9.73
LB3w	2013	3	mt58	48.81	44-53	3.9	-2.98	9.5
LB3w	2013	7	mt122	42.91	39-46	3.6	2.87	8.53
LB3w	2014	1	mt5	6.81	05-09	4.9	-2.59	11.77
LB3s	2013	2	mt37	39.31	34.8-42	3.4	-2.47	8.91
LB3s	2014	1	mt27	78.01	74-81	2.8	2.13	6.59
LB3s	2014	2	mt38	39.71	36-45	5.3	-3.29	12.87

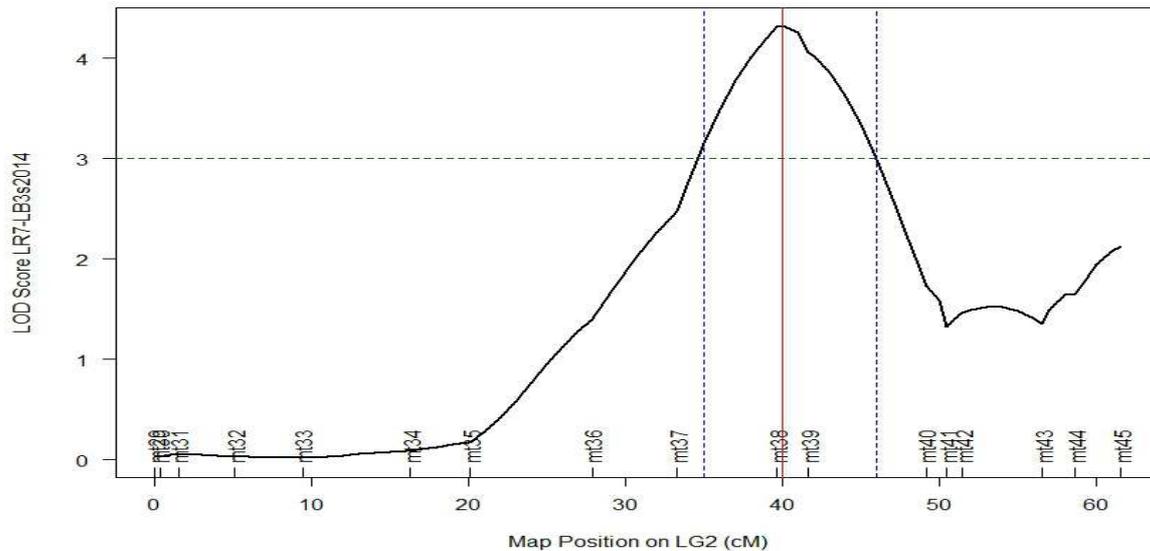


Fig. 43 : LOD Score pour la longueur du rameau principal en condition stressée (2014) sur le chromosome 2

4 Discussion

4.1 Variation génétique

Les résultats obtenus à partir de la population de RILs (LR7), que ce soit pour les caractères végétatifs notés avant l'application du stress hydrique ou bien pour les caractères de fitness (condition irriguée ou sous stress hydrique) sur les deux années d'essai, ont révélé une grande variabilité génétique. Sur cette même population (LR7), mais en condition saline, Foroozfar *et al.* (2014) ont aussi trouvé un résultat similaire.

En comparaison avec les deux parents (TN1.17 x A17), la population de RILs a montré une ségrégation transgressive notable dans les deux traitements, ce qui pourrait être interprété par l'effet de l'accumulation d'allèles positifs (ou négatifs) provenant des deux génotypes parentaux. Certaines de ces nouvelles combinaisons alléliques pourraient entraîner une meilleure fitness et une meilleure adaptation aux conditions environnementales (Siol *et al.*, 2008). Ce résultat indique que, grâce à la variation génétique et à la recombinaison génétique disponibles dans les populations naturelles, de nouveaux génotypes avec une meilleure adaptation aux conditions de sécheresse peuvent être sélectionnés au sein d'une descendance à faible différenciation phénotypique. Des résultats similaires ont été trouvés sur différentes populations de *M. truncatula* : en condition de stress hydrique précoce (Badri *et al.*, 2011), en condition des stress salin (Arraouadi *et al.*, 2010 ; Foroozfar *et al.*, 2014), en condition de gelé (Avia *et al.*, 2013a), pour des caractères de germination (Dias *et al.*, 2011), pour des caractères morphologiques

(Julier *et al.*, 2007) ou bien pour la date de floraison (Pierre *et al.*, 2008).

4.2 Analyse des corrélations

Avant l'application du stress hydrique, des corrélations phénotypiques négatives ont été trouvées entre la date de floraison et les paramètres relatifs au développement végétatif de la plante. Les génotypes à floraison tardive ont, par conséquent, des branches primaires plus courtes, moins d'entrenœuds et de branches primaires et une vigueur plus faible que les génotypes à floraison précoce. Ces résultats sont concordant avec ceux trouvés par Julier *et al.* (2007) et Lagunes Espinoza *et al.* (2012) qui ont trouvé une corrélation négative entre la date de floraison et les caractères liés au développement végétatif dans d'autres populations de RILs de *M. truncatula*.

4.3 Héritabilité

L'héritabilité, à sens large (H^2), calculée pour les caractères mesurés après la floraison sous les deux traitements hydriques, a montrée des valeurs modérées n'excédant pas 0,53. Alors que pour les caractères végétatifs notés avant le stade début floraison (Avant application du stress hydrique), l'héritabilité a atteint 0,66 pour la date de floraison. Selon Tuberosa (2012), la plupart des caractères qui déterminent les performances des cultures dans des conditions de sécheresse ont généralement une héritabilité faible (0,3-0,4) ou, au mieux, intermédiaire (0,4-0,7). En effet, selon Barton and Turelli (1989), les caractères fortement associés à la fitness ont tendance à présenter une faible héritabilité. Ils sont généralement moins héréditaires que les caractères morphologiques ou physiologiques (Mousseau and Roff, 1987). Dans notre étude, la faiblesse de l'héritabilité peut être justifiée par une plus grande variance environnementale plutôt que par une variance génétique faible, comme suggérée par Barton and Turelli (1989).

4.4 Cartographie des QTL

Cette étude représente la première analyse QTL pour des caractères de fitness appliqué sur la plante modèle *M. truncatula*. Des QTL ont été trouvés pour la majorité des caractères étudiés et sur la plupart des chromosomes du génome de la plante. Beaucoup de QTL ont été identifiés, que ce soit pour les caractères végétatifs avant application du stress hydrique ou bien pour les caractères de fitness en condition irriguée ou stressée et ceci pour les deux années d'expérience.

En se basant sur les intervalles de confiance des différents QTL, des co-localisations de QTL ont été trouvés sur la plupart des chromosomes. Dans la plupart des cas ces co-localisations sont compatibles avec les corrélations entre les différents caractères. Pour les caractères végétatifs, la date de floraison et la longueur de la première branche primaire ont été fortement corrélées et le QTL pour la date de floraison sur le chromosome 7 a été trouvé exactement à la même position

que le QTL pour la longueur de la première branche primaire. Des résultats similaires de co-localisations entre la date de floraison et des QTL de caractères morphologiques ont été décrits dans d'autres populations de RILs de *M. Truncatula* (Julier *et al.*, 2007 ; Pierre *et al.*, 2008 ; Lagunes Espinoza and Julier, 2013 ; Foroozanfar *et al.*, 2014).

Pour les caractères de fitness, le poids total des gousses par plante (TPW) et le nombre total de gousses par plante (TPN) en condition de stress hydrique (2013) sont fortement corrélés et leurs QTL sont situés dans la même position sur le chromosome 7. Dans une étude visant à identifier l'architecture génétique de divers caractères de fitness sur *Brassica rapa* en plein champs et sous serre, Dechaine *et al.* (2014) ont constaté que plusieurs caractères de fitness présentaient de fortes corrélations et une co-localisation des QTL détectés dans les différents environnements.

Ces différents exemples de co-localisation suggèrent une régulation génétique commune pour les caractères qui sont corrélés. Cependant Il n'est pas possible de faire la distinction entre la pléiotropie et la liaison génétique (linkage) comme cause d'un effet corrélé sur deux caractères jusqu'à ce que ce que l'on ait passé à la cartographie fine (QTN) de ce QTL (Mackay, 2001 ; Tuberosa, 2002).

La plupart des QTL qui concernent les caractères de fitness ont été trouvés sur le chromosome 7. Ces derniers co-localisent avec des QTL de caractères végétatifs et de la date de floraison. Cependant, bien qu'on s'attende à trouver une co-localisation entre QTL pour les caractères végétatifs et la date de floraison en raison de leur corrélation phénotypique, la co-localisation observée entre QTL pour la date de floraison et les caractères de fitness n'était pas envisagée. En effet, dans notre essai, le stress hydrique a été appliqué après la floraison de chaque lignée afin d'étudier séparément la date de floraison et les caractères de fitness. Toutefois, il est bien connu que la date de floraison est un composant majeur de la fitness car elle joue un rôle important dans l'adaptation des populations aux conditions climatiques ou environnementales stressantes (Kelly and Levin, 2000 ; Le Corre *et al.*, 2002 ; Dittmar *et al.*, 2014 ; Friesen *et al.*, 2014).

D'autres QTL pour les caractères de fitness (en contrôle et en stressé) ont été trouvés sur le chromosome 4 mais pas de co-localisation avec des caractères végétatifs. C'est le cas aussi dans certains travaux similaires, notamment sur le blé (Quarrie *et al.*, 2006), le pois (Burstin *et al.*, 2007) ou bien sur *Brassica rapa* (Dechaine *et al.*, 2014) où aucune co-localisation de QTL de caractères reproductifs avec des caractères végétatifs n'a été observé.

Des QTL de fitness ont également été trouvés sur les chromosomes 1, 2, 3 et 5 dans les deux conditions expérimentales, mais ils n'ont expliqué qu'une faible proportion de la variation

phénotypique. Certains des QTL révélés étaient spécifiques à un seul caractère dans une seule condition environnementale. Selon Arraouadi *et al.* (2010) et Foroozanfar *et al.* (2014), ces régions peuvent contenir des gènes adaptatifs différents qui ne sont pas stables entre les conditions contrôlées et les conditions stressées, mais confèrent plus d'adaptation à la plante dans chaque condition. D'autres QTL interviennent dans les deux conditions de stress. Dans ce cas, ces régions peuvent contenir des gènes qui ne sont pas impliqués dans des mécanismes d'adaptation au stress hydrique, mais sont liés aux différences génétiques globales entre les génotypes, permettant à un génotype donné d'avoir une fitness quelles que soient les conditions (Foroozanfar *et al.*, 2014)

Dans cette étude et comme c'est le cas aussi dans d'autres études sur le déterminisme génétique des QTL de tolérance au stress hydrique, aucun QTL majeur spécifique à la sécheresse ou à la condition irriguée n'a été détecté. Des résultats similaires ont été trouvés chez le tournesol (Poormohammad Kiani *et al.*, 2009) chez *M. truncatula* (Badri *et al.*, 2011) et chez le pois chiche (Varshney *et al.* 2014). La plupart des QTL ont exprimé de faibles effets additifs suggérant que la réponse à la sécheresse est régie par plusieurs gènes avec des effets faibles (Ashraf, 2010). C'est ce qui explique le fait que de nombreux gènes sont impliqués dans l'expression de caractères quantitatifs. Dans ce cas de figure, les gènes individuels ont généralement de petits effets. Cela implique que plusieurs QTL doivent être manipulés en même temps par le sélectionneur pour obtenir un impact significatif (Cattivelli *et al.*, 2008). Cependant, cela n'empêche pas les possibilités d'adaptation des populations au stress. En effet, la sélection d'individus transgressifs, portant une nouvelle combinaison d'allèles positifs à différents loci en raison de la recombinaison génétique, aura une meilleure fitness que les génotypes d'origine. De même, les programmes de sélection, de préférence conduits avec des méthodes assistées par marqueurs (SAM) pourraient générer des génotypes tolérants au stress dans les espèces cultivées.

Synthèse générale et perspective

Synthèse générale

L'objectif général de cette thèse était d'intégrer les connaissances tirées de l'étude du génome de la plante modèle *Medicago truncatula* pour améliorer les performances agronomiques de certaines espèces cultivées d'importance économique, notamment en condition de sécheresse. L'objectif qu'on s'est fixé à travers ce projet de thèse est d'identifier les déterminants génétiques (QTL) pour des caractères de fitness chez *Medicago truncatula* en réponse à un stress hydrique cyclique et progressive de fin de cycle (début floraison) en exploitant la variabilité génétique naturelle existante.

Dans un premier chapitre nous avons abordé l'étude de la variabilité génétique existante chez quelques lignées de l'espèce *M. truncatula* et la détermination des caractères de fitness les plus affectés par le stress hydrique (déficit) appliqué. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons entamé un premier essai (2011) où nous avons commencé par choisir 10 lignées d'origines méditerranéennes diverses (A10, A17, DZA315.16, F83005.5, F83005.9, TN1.11, TN1.21, TN6.18, et TN8.3), qui à l'exception d'ALG423-406, appartiennent à une collection de lignées qui sont utilisées dans le séquençage du génome de *M. truncatula* et dont plusieurs cartes génétiques ainsi que des populations de RILs sont issues du croisement entre ces 10 lignées.

Le choix de la méthode qui a été utilisée pour appliquer le stress hydrique a été motivée par le souci de se rapprocher le plus possible des conditions que subit la plante dans son environnement naturel. En effet, l'originalité de ce travail réside dans le fait que nous avons appliqué un stress hydrique cyclique qui consiste à priver la plante d'eau jusqu'à atteindre un taux de tarissement de 80% de la réserve utile (RU) et à l'irriguer ensuite pour que la plante puisse retourner aux conditions initiales. En effet, les cycles de stress et de réhydratation sont des processus qui se manifestent dans des conditions naturelles au cours des différentes saisons, et dans les pratiques agricoles telles que l'irrigation et le lessivage du sel. Cette opération est répétée plusieurs fois avec comme objectif de mimer ce qui se passe dans la nature où la plante subit une période de précipitations suivie de périodes de sécheresse et ainsi de suite.

Les résultats obtenus ont révélé une très grande variabilité génétique entre les génotypes étudiés quel que soit le régime hydrique. La comparaison entre les moyennes obtenues en condition stressée avec celles de la condition non stressée a mis en évidence une diminution considérable pour la plupart des caractères étudiés, notamment pour le poids total des gousses, le nombre total de gousses et le nombre total de graines par plante. Parmi les différents génotypes étudiés le génotype de référence A17 (utilisé dans les différentes études génomiques) et le génotype d'origine tunisienne TN1.11 (collecté dans une région saline) ont montré des résultats

contrastants dans la condition stressée. La classification ascendante hiérarchique a permis de classer les génotypes étudiés en 4 groupes distincts : A17, TN1.21 / ALG423-406, F83005.5, F83005.9, DZA315.16 / TN8.3, TN1.11 / TN6.18, A10.

Dans un deuxième chapitre nous avons entamé l'étude des bases génétiques de la tolérance au stress hydrique chez *M. truncatula*. Pour entamer ce genre d'études nous avons besoin d'une population de lignées recombinantes issue du croisement entre deux parents contrastés, dans notre cas nous avons choisi la population de lignées recombinantes LR7, issue du croisement entre deux génotypes (lignées pures) TN1.11 x A17. Le choix de ces deux génotypes parentaux repose sur le fait qu'ils sont contrastants pour la majorité des caractères de fitness étudiés mais aussi au fait qu'ils sont connues pour être contrastant pour différents caractères morpho-physiologiques en condition de stress salins. Le choix de la population de lignées recombinantes LR7 a aussi été motivé par la disponibilité d'une carte génétique saturée prête pour être utilisée immédiatement.

Afin d'entamer la deuxième partie de notre essai nous avons choisi d'utiliser le 'split plot augmented design' comme dispositif expérimental. L'intérêt de ce dispositif est qu'il a été conçu pour les essais qui génèrent un nombre très important d'unités expérimentales et qu'il serait très difficile d'installer ou de contrôler sur le terrain, plus particulièrement les études QTL.

Deux essais similaires ont été réalisés sur deux années successives (2013 et 2014). Les résultats de phénotypage obtenus à partir de la population RIL (LR7) ont été utilisés pour la détection des QTL que ce soit pour les caractères végétatifs notés avant l'application du stress hydrique ou bien pour les caractères de fitness (condition normal ou sous stress hydrique).

- L'analyse de variance sur les deux années d'essai a révélée une grande variabilité génétique entre les différentes lignées pour les caractères étudiés;
- la population RIL a montré une ségrégation transgressive notable par rapport aux deux parents dans les deux traitements.
- Avant l'application du stress hydrique, des corrélations phénotypiques négatives ont été trouvées entre la date de floraison et les paramètres relatifs au développement végétatif de la plante. Ceci implique que les génotypes à floraison tardive ont des branches primaires plus courtes avec moins d'entre-nœuds et une vigueur plus faible que les lignées à floraison précoce.
- L'héritabilité à sens large (H^2) calculée pour les caractères mesurés après la floraison dans les deux conditions de régimes hydrique a montrée des valeurs modérées n'excédant pas 0,53.

- L'analyse de QTL nous a permis de trouver 49 QTL, dont 6 pour les paramètres relevés jusqu'au stade début floraison et 43 QTL pour les caractères relevés après stade début floraison (application ou non d'un stress hydrique), ceci durant les deux années d'expérimentation. Au total 17 QTL en été trouvé en condition stressé et 26 QTL en condition contrôle.
- Un à trois QTL ont été mis en évidence pour chaque paramètre en fonction de l'année d'expérimentation et de la condition hydrique appliquée aux lignées.
- À l'exception du chromosome 6, des QTL ont été trouvés sur chaque chromosome, avec un effet des allèles parfois positif, parfois négatif.
- Le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL se situe entre 6% et 38%.
- Le nombre le plus élevé de QTL a été trouvé sur le chromosome 7 avec 16 QTL. Ce dernier rassemble des QTL représentant des caractères notés dans différentes conditions et qui co-localisent. La plupart des QTL qui concernent les caractères de fitness ont été trouvés sur ce chromosome.
- Le LOD score le plus élevé (21.7) a été trouvé sur ce chromosome pour la date de floraison, la variance phénotypique expliquée étant de 38%.
- Plusieurs caractères fortement corrélés et dont leurs QTL sont en co-localisation ont été trouvés notamment sur le chromosome 7, suggèrent une régulation génétique commune pour les caractères qui sont corrélés.

Perspectives

Au terme de cette thèse nous pouvons dire que notre compréhension du comportement des plantes légumineuse vis-à-vis d'un stress hydrique tardif et ces répercussions sur des paramètres de fitness ou de production (espèces cultivées) sera plus claire à la lumière des résultats obtenus. Cependant et dans une perspective plus large, Nous suggérons que d'autres essais similaires puissent être effectués notamment sur d'autres populations de RILs afin de vérifier la stabilité des zones du génome impliquées dans l'expression des caractères étudiés. D'autres caractères peuvent aussi être étudiés comme les caractères physiologiques pour voir si ce sont les mêmes QTL qui interviennent. On pourrait aussi faire varier le type de stress hydrique appliqués à travers différents environnements pour faire la distinction entre les QTL constitutifs et les QTL spécifiques aux environnements.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

1. Abberton, M., J. Batley, A. Bentley, J. Bryant, H. Cai, J. Cockram, A. Costa de Oliveira, L. J. Cseke, H. Dempewolf, C. De Pace, D. Edwards, P. Gepts, A. Greenland, A. E. Hall, R. Henry, K. Hori, G. T. Howe, S. Hughes, M. Humphreys, D. Lightfoot, A. Marshall, S. Mayes, H. T. Nguyen, F. C. Ogonnaya, R. Ortiz, A. H. Paterson, R. Tuberosa, B. Valliyodan, R. K. Varshney, and M. Yano. 2016. Global agricultural intensification during climate change: A role for genomics. *Plant Biotechnology Journal* 14:1095–1098.
2. Abdelguerfi, A. 1976. Contribution à l'étude de la répartition des espèces de luzernes annuelles en fonction des facteurs du milieu (202 stations) ; liaison entre les caractères de ces 600 populations étudiées à Beni Slimane et leur milieu d'origine ». Thèse d'Ing. INA El Harrach Alger:1–74.
3. Abdelguerfi, A. 1978. Ecologie des luzernes annuelles en Algérie. Thèse de Magister, INA El Harrach Alger:1–105.
4. Abdelguerfi, A., J.-Y. Chapot, and A. P. Conesa. 1988. l'étude de la répartition des luzernes annuelles spontanées en Algérie selon certains facteurs du milieu. *Fourrages* 113:89–106.
5. Abdelguerfi, A. 2002. Ressources génétiques d'intérêt pastoral et/ou fourrager : Distribution et variabilité chez les légumineuses spontanées (*Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarum* et *Onobrychis* en Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques:1–433.
6. Abdelguerfi, A., and M. Abdelguerfi-Laouar. 2004. Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et / ou pastoral : Diversité , collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *Ciheam* 41:29–41.
7. Anderson, J. T., J. H. Willis, and T. Mitchell-Olds. 2011. Evolutionary genetics of plant adaptation. *Trends in genetics : TIG* 27:258–66.
8. Anjum, S. A., L. Wang, M. Farooq, I. Khan, and L. Xue. 2011. Methyl Jasmonate-Induced Alteration in Lipid Peroxidation, Antioxidative Defence System and Yield in Soybean Under Drought. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197:296–301.
9. Araújo, S. S., S. Beebe, M. Crespi, B. Delbreil, E. M. González, V. Gruber, I. Lejeunehenaut, W. Link, M. J. Monteros, I. Rao, V. Vadez, and M. C. V. Patto. 2015. Abiotic stress responses in legumes: strategies used to cope with environmental challenges. *Critical Reviews in Plant Sciences*:37–41.
10. Aronson, J., J. Kigel, a. Shmida, and J. Klein. 1992. Adaptive phenology of desert and

- Mediterranean populations of annual plants grown with and without water stress. *Oecologia* 89:17–26.
11. Arraouadi, S., M. Badri, C. Abdelly, T. Huguet, and M. E. Aouani. 2012. QTL mapping of physiological traits associated with salt tolerance in *Medicago truncatula* Recombinant Inbred Lines. *Genomics* 99:118–125.
 12. Arraouadi, S., M. Badri, W. Taamalli, T. Huguet, and M. E. Aouani. 2011. Variability salt stress response analysis of Tunisian natural populations of *Medicago truncatula* (Fabaceae) using salt response index (SRI) ratio. *African Journal of Biotechnology* 10:10636–10647.
 13. Arraouadi, S., F. Chardon, T. Huguet, M. E. Aouani, and M. Badri. 2010. QTLs mapping of morphological traits related to salt tolerance in *Medicago truncatula*. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:917–926.
 14. Ashraf, M. 2010. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances* 28:169–183.
 15. Asíns, M. J. 2002. Review Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121:281–291.
 16. Atwell, B., P. Kriedemann, and C. Turnbull. 1999. Plant in action: adaptation in nature, performance in cultivation. Page (Turnbull CGN, Ed.). Macmillan Education Australia Melbourne, Australia.
 17. Avia, K., M.-L. Pilet-Nayel, N. Bahrman, A. Baranger, B. Delbreil, V. Fontaine, C. Hamon, E. Hanocq, M. Niarquin, H. Sellier, C. Vuylsteker, J.-M. Prospero, and I. Lejeune-Hénaut. 2013. Genetic variability and QTL mapping of freezing tolerance and related traits in *Medicago truncatula*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 126:2353–2366.
 18. Bacelar, E. L. V. A., B. M. C. G. José M. Moutinho-Pereira, C. V. Q. Brito, J. Gomes-Laranjo, H. M. F. F. Correia, and C. M. 2012. Water Use Strategies of Plants Under Drought Conditions. Page in R. Aroca., editor. *Plant Responses to Drought Stress*. Springer,.
 19. Badri, M., S. Arraouadi, T. Huguet, and M. E. Aouani. 2013. Comparative effects of water deficit on *Medicago laciniata* and *Medicago truncatula* lines sampled from sympatric populations 1:37–43.
 20. Badri, M., F. Chardon, T. Huguet, and M. E. Aouani. 2011. Quantitative trait loci associated with drought tolerance in the model legume *Medicago truncatula*. *Euphytica* 181:415–428.
 21. Badri, M., G. Toumi, S. Mahfoudh, K. Hessini, M. Abdelguerfi-Laouar, A. Abdelguerfi,

- M. E. Aouani, C. Abdelly, and N. Djébali. 2016. Diversity of response to drought in a collection of lines of *Medicago truncatula*, *M. ciliaris*, and *M. polymorpha*. *Crop Science* 56:3125–3132.
22. Baier, M., A. Kandlbinder, D. Gollmack, and K. Dietz. 2005. Oxidative stress and ozone-perception, signalling and response. PDF:1012–1020.
 23. Barker, D. G., S. Bianchi, F. Blondon, G. Duc, S. Essad, P. Flament, G. Génier, P. Guy, X. Muel, J. Dénarié, and T. Huguet. 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the rhizobium- legume symbiosis. *Plant molecular biology reporter* 8:40–49.
 24. Bartels, D., and R. Sunkar. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:23–58.
 25. Barton, N. H., and M. Turelli. 1989. Evolutionary quantitative genetics : How little do we know? *Annu Rev Genet* 23:337—370.
 26. Basten, C. J., B. S. Weir, and Z. B. Zeng. 2005. QTL Cartographer Version 1 . 17. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh.
 27. Bataillon, T., and J. Ronfort. 2006. Evolutionary and Ecological Genetics of *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula handbook*:1–12.
 28. Baum, M., S. Grandi, G. Backes, a. Jahoor, a. Sabbagh, and S. Ceccarelli. 2003. QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross “Arta” x *H. spontaneum* 41-1. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1215–1225.
 29. Bell, C. J., R. A. Dixon, A. D. Farmer, R. Flores, J. Inman, R. A. Gonzales, M. J. Harrison, N. L. Paiva, A. D. Scott, J. W. Weller, and G. D. May. 2001. The *Medicago* Genome Initiative : a model legume database 29:114–117.
 30. Ben, C., M. Toueni, S. Montanari, M.-C. Tardin, M. Fervel, A. Negahi, S.-P. Laure, G. Mathieu, M.-C. Gras, D. Noël, J.-M. Prospéri, M.-L. Pilet-Nayel, A. Baranger, T. Huguet, B. Julier, M. Rickauer, and L. Gentzbittel. 2013. Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt. *Journal of Experimental Botany* 63:695–709.
 31. Berger, J. D., and C. Ludwig. 2014. Contrasting adaptive strategies to terminal drought-stress gradients in Mediterranean legumes: phenology, productivity, and water relations in wild and domesticated *Lupinus luteus* L. *Journal of Experimental Botany* 65:6219–6229.
 32. Beyene, Y., K. Semagn, S. Mugo, A. Tarekegne, R. Babu, B. Meisel, P. Sehabiague, D. Makumbi, C. Magorokosho, S. Oikeh, J. Gakunga, M. Vargas, M. Olsen, B. M. Prasanna,

- M. Banziger, and J. Crossa. 2015. Genetic gains in grain yield through genomic selection in eight bi-parental maize populations under drought stress. *Crop Science* 55:154–163.
33. Blum, A. 2011. *Plant Breeding for Water-Limited Environments*. Springer New York, New York, NY.
34. Blum, A., P. O. Box, T. Aviv, and I. Email. 2005. Drought resistance , water-use efficiency , and yield potential — are they compatible , dissonant , or mutually exclusive ? 1159–1168.
35. Blum, a. 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation* 20:135–148.
36. Bodner, G., A. Nakhforoosh, and H.-P. Kaul. 2015. Management of crop water under drought: a review. *Agronomy for Sustainable Development*:401–442.
37. Boyer, J. S. 1982. Plant productivity and environment. *science* 218:443–448.
38. Boyer, J. S. 1996. *Advances in Drought Tolerance in Plants*. Page *Advances in Agronomy*. Elsevier Masson SAS.
39. Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890.
40. Bucciarelli, B., J. Hanan, D. Palmquist, and C. P. Vance. 2006. A Standardized Method for Analysis of *Medicago truncatula* Phenotypic Development. *Plant Physiology* 142:207–219.
41. Burr, F. A., and B. Burr. 1991. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trnds in Genetics* 7:55–60.
42. Burstin, J., P. Marget, M. Huart, A. Moessner, B. Mangin, C. Duchene, B. Desprez, N. Munier-Jolain, and G. Duc. 2007. Developmental genes have pleiotropic effects on plant morphology and source capacity, eventually impacting on seed protein content and productivity in pea. *Plant Physiology* 144:768–781.
43. Cattivelli, L., F. Rizza, F.-W. Badeck, E. Mazzucotelli, A. M. Mastrangelo, E. Francia, C. Marè, A. Tondelli, and a. M. Stanca. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105:1–14.
44. Charcosset, A., and A. Gallais. 1996. Estimation of the contribution of quantitative trait loci (QTL) to the variance of a quantitative trait by means of genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1193–1201.
45. Charmet, G. 2011. DE LA DETECTION DE QTL A LA GENETIQUE D'ASSOCIATION. *Le Sélectionneur Français* 2011:17–29.
46. Chebouti, A., and A. Abdelguerfi. 2000. Effet du stress hydrique sur la production de gousses et de graines chez quelques populations de *Medicago truncatula* (L.) Gaertn. *Cahiers Options Méditerranéennes*:237–240.

47. Chen, H., and J. G. Jiang. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews* 18:309–319.
48. Choi, H.-K., J.-H. Mun, D.-J. Kim, H. Zhu, J.-M. Baek, J. Mudge, B. Roe, N. Ellis, J. Doyle, G. B. Kiss, N. D. Young, and D. R. Cook. 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15289–15294.
49. Churchill, G., and R. Doerge. 1994. Empirical Threshold Values for Quantitative Trait. *Genetics Society of America* 138:963–971.
50. Claeys, H., and D. Inzé. 2013. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant physiology* 162:1768–79.
51. Clarkson, N. M., and J. S. Russell. 1976. Effect of water stress on phasic development of annual medicago species. *Australian Journal of Agricultural Research* 27:227–234.
52. Collins, N. C., F. Tardieu, and R. Tuberosa. 2008. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant physiology* 147:469–86.
53. Le Corre, V., F. Roux, and X. Reboud. 2002. DNA polymorphism at the FRIGIDA gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time. *Molecular biology and evolution* 19:1261–1271.
54. Cortés, A. J., D. This, C. Chavarro, S. Madriñán, and M. W. Blair. 2012. Nucleotide diversity patterns at the drought-related DREB2 encoding genes in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 125:1069–1085.
55. Cruz-Izquierdo, S., C. M. Avila, Z. Satovic, C. Palomino, N. Gutierrez, S. R. Ellwood, H. T. T. Phan, J. I. Cubero, and a. M. Torres. 2012. Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: Stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics* 125:1767–1782.
56. Dai, L., D. Vorselen, K. S. Korolev, and J. Gore. 2012. Generic Indicators for Loss of Resilience Before a Tipping Point Leading to Population Collapse. *Science* 336:1175–1177.
57. Dechaine, J. M., M. T. Brock, and C. Weinig. 2014. QTL architecture of reproductive fitness characters in *Brassica rapa*. *BMC plant biology* 14:66.
58. Deikman, J., M. Petracek, and J. E. Heard. 2012. Drought tolerance through biotechnology: Improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Current Opinion in Biotechnology* 23:243–250.
59. Delalande, M., S. Greene, S. Hughes, R. Nair, T. Huguet, M. E. Aouani, and J. M. Prospero. 2007. Wild accessions / populations Table of contents : *Medicago truncatula*

- handbook:1–27.
60. Dias, P. M. B., S. Brunel-Muguet, C. Dürr, T. Huguet, D. Demilly, M.-H. Wagner, and B. Teulat-Merah. 2011. QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 122:429–444.
 61. Dita, M. A., N. Rispaïl, E. Prats, D. Rubiales, and K. B. Singh. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147:1–24.
 62. Dittmar, E. L., C. G. Oakley, J. Ågren, and D. W. Schemske. 2014. Flowering time QTL in natural populations of *Arabidopsis thaliana* and implications for their adaptive value. *Molecular Ecology*:4291–4303.
 63. Djemel, N., D. Guedon, A. Lechevalier, C. Salon, M. Miquel, J. M. Prosperi, C. Rochat, and J. P. Boutin. 2005. Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:557–566.
 64. Doerge, R. W., Z.-B. Zeng, and B. S. Weir. 1997. Statistical issues in the search for genes affecting quantitative traits in experimental populations. *Statistical Science* 12:195–219.
 65. Dolferus, R. 2014. To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Science* 229:247–261.
 66. Doyle, J. J., and M. A. Luckow. 2003. The Rest of the Iceberg . Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context 1. *Plant Physiology* 131:900–910.
 67. Dudley, J. W. 1993. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Science* 33:660–668.
 68. Durand, J.-L. 2007. Les effets du déficit hydrique sur la plante : aspects physiologiques. *Acte de Journées de l'APFP* 190:181–195.
 69. Dwiyantri, M. S., and T. Yamada. 2013. Molecular Mapping and Breeding for Genes/QTLs Related to Climate Change. Pages 179–212 in C. Kole, editor. *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
 70. Farook, M., A. WWahid, N. Kobayashi, D. Fujita, and S. M. . Basra. 2009. Review article Plant drought stress : e ff ects , mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev* 29:185–212.
 71. Fédérer, W. T., and F. O. Arguillas. 2006. Augmented Split Plot Experiment Design. *Journal of Crop Improvement* 15:81–96.
 72. Feng, X., A. Porporato, and I. Rodriguez-Iturbe. 2013. Changes in rainfall seasonality in the tropics. *Nature Climate Change* 3:811–815.

73. Fletcher, R. S., J. L. Mullen, A. Heiliger, and J. K. McKay. 2015. QTL analysis of root morphology, flowering time, and yield reveals trade-offs in response to drought in *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany* 66:245–256.
74. Foroozanfar, M., S. Exbrayat, L. Gentzbittel, G. Bertoni, P. Maury, M. R. Naghavi, A. Peyghambari, M. Badri, C. Ben, F. Debelle, and A. Sarra. 2014. Genetic variability and identification of quantitative trait loci affecting plant growth and chlorophyll fluorescence parameters in the model legume *Medicago truncatula* under control and salt stress conditions. *Functional Plant Biology* 41:983–1001.
75. Franks, S. J., S. Sim, and A. E. Weis. 2007. Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:1278–1282.
76. Friesen, M. L., E. J. B. Von Wettberg, M. Badri, K. S. Moriuchi, F. Barhoumi, P. L. Chang, S. Cuellar-ortiz, M. A. Cordeiro, W. T. Vu, S. Arraouadi, N. Djéballi, K. Zribi, Y. Badri, S. S. Porter, M. E. Aouani, D. R. Cook, S. Y. Strauss, and S. V. Nuzhdin. 2014. The ecological genomic basis of salinity adaptation in Tunisian *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*:1160.
77. Gallais, A., and M. Rives. 1993. Detection, Number and Effects of Qtls for a Complex Character. *Agronomie* 13:723–738.
78. Garmier, M., L. Gentzbittel, J. Wen, K. S. Mysore, and P. Ratet. 2017. *Medicago truncatula*: Genetic and Genomic Resources. *Current Protocols in Plant Biology* 2:318–349.
79. Geber, M. A., and L. R. Griffen. 2003. Inheritance and Natural Selection on Functional Traits. *International Journal of Plant Sciences* 164:S21–S42.
80. Gentzbittel, L., S. U. Andersen, C. Ben, and M. Rickauer. 2015. Naturally occurring diversity helps to reveal genes of adaptive importance in legumes. *Frontiers in Plant Science* 105:1–8.
81. Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *The Plant cell* 8:1871–1883.
82. González, E. M., P. M. Aparicio-tejo, A. J. Gordon, F. R. Minchin, M. Royuela, and C. Arrese-igor. 1998. Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany* 49:1705–1714.
83. González, E. M., A. J. Gordon, C. L. James, and C. Arrese-Igor. 1995. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany*

- 46:1515–1523.
84. González, E. M., R. Ladrera, E. Larrainzar, and C. Arrese-Igor. 2007. Response of *Medicago truncatula* to abiotic stress :response of *Medicago truncatula* to drought. *The Medicago truncatula Handbook*:7–32.
 85. Hajjar, R., and T. Hodgkin. 2007. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156:1–13.
 86. Haley, C. S., and S. A. Knott. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315–324.
 87. Hamwieh, A., M. Imtiaz, and R. S. Malhotra. 2013. Multi-environment QTL analyses for drought-related traits in a recombinant inbred population of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 126:1025–1038.
 88. Hauggaard-Nielsen, H., B. Jørnsgaard, J. Kinane, and E. S. Jensen. 2008. Grain legume - Cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems* 23:3–12.
 89. Hill, W. G., and T. F. C. Mackay. 2004. D. S. Falconer and introduction to quantitative genetics. *Genetics* 167:1529–1536.
 90. Hossain, M. A., S. H. Wani, S. Bhattacharjee, D. J. Burritt, and L.-S. P. Tran. 2016. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*, PP : 526, Springer.
 91. Hu, H., and L. Xiong. 2014. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual review of plant biology* 65:715–41.
 92. Huguet, T., and J.-M. Prospero. 1996. *Medicago truncatula*: a legume model-plant. *CIHEAM - Options Méditerranéennes* 18:171–175.
 93. Idrissi, O., S. M. Udupa, E. De Keyser, R. J. McGee, C. J. Coyne, G. C. Saha, F. J. Muehlbauer, P. Van Damme, and J. De Riek. 2016. Identification of Quantitative Trait Loci Controlling Root and Shoot Traits Associated with Drought Tolerance in a Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Recombinant Inbred Line Population. *Frontiers in Plant Science* 7.
 94. Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinstein, and A. Kilian. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research* 29:E25.
 95. Jansen, R. C., and P. Stam. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447–1455.
 96. Journet, E., V. Carreau, J. Gouzy, P. Thoquet, C. Rosenberg, D. Barker, T. Huguet, J. Denarie, and P. Gamas. 2001. *La légumineuse modèle Medicago truncatula : approches*

- génomiques et perspectives approches génomiques et perspectives. Ecole thématique Biologie végétale.
97. Juenger, T. E. 2013. Natural variation and genetic constraints on drought tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* 16:274–281.
 98. Julier, B., T. Huguet, F. Chardon, R. Ayadi, J.-B. Pierre, J.-M. Prosperi, P. Barre, and C. Huyghe. 2007. Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 114:1391–1406.
 99. Kaiser, W. M. 1987. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 71:142–149.
 100. Kang, Y., M. Sakiroglu, N. Krom, J. Stanton-Geddes, M. Wang, Y. C. Lee, N. D. Young, and M. Udvardi. 2015. Genome-wide association of drought-related and biomass traits with HapMap SNPs in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment* 38:1997–2011.
 101. Kelly, M. G., and D. A. Levin. 2000. Directional selection on initial flowering date in *Phlox drummondii* (Polemoniaceae). *American journal of botany* 87:382–91.
 102. Khazaei, H., D. M. O’Sullivan, M. J. Sillanpää, and F. L. Stoddard. 2014. Use of synteny to identify candidate genes underlying QTL controlling stomatal traits in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theor Appl Genet* 127:2371–2385.
 103. Knight, C. A., H. VOGEL, J. KROYMANN, A. Shumate, H. Witsenboer, and T. Mitchell-Olds. 2006. Expression profiling and local adaptation of *Boechera holboellii* populations for water use efficiency across a naturally occurring water stress gradient. *Molecular Ecology* 15:1229–1237.
 104. Kooyers, N. J. 2015. The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 234:155–62.
 105. Lagunes Espinoza, L. D. C., T. Huguet, and B. Julier. 2012. Multi-population QTL detection for aerial morphogenetic traits in the model legume *Medicago truncatula*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 124:739–54.
 106. Lagunes Espinoza, L. D. C., and B. Julier. 2013. QTL detection for forage quality and stem histology in four connected mapping populations of the model legume *Medicago truncatula*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 126:497–509.
 107. Lander, E. S., and S. Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185.

108. Latha, R., L. Rubia, J. Bennett, and M. S. Swaminathan. 2004. Allele mining for stress tolerance genes in *Oryza* species and related germplasm. *Molecular biotechnology* 27:101–108.
109. Lawlor, D. W. 2013. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany* 64:83–108.
110. Leport, L., N. C. Turner, S. L. Davies, and K. H. M. Siddique. 2006. Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. *European Journal of Agronomy* 24:236–246.
111. Lesins, K., and I. Lesins. 1979. *Genus Medicago (Leguminosae): A Taxogenetic Study*. Dr. W. Junk, The Hague-Boston-London.
112. Levitt, J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses: Chilling, freezing and high temperature stresses*. Academic press, New York, NY.
113. Li, J., X. Dai, T. Liu, and P. X. Zhao. 2012. LegumeIP: An integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes. *Nucleic Acids Research* 40:1221–1229.
114. Liu, B. H. 1998. *Genomics, Linkage Mapping and QTL Analysis*. CRC press. FL, Boca Raton.
115. Ludlow, M. 1989. Strategies of response to water stress. Pages 269–281 in K. Kreeb, H. Richter, and T. Hinckley, editors. *Structural and functional responses to environmental stresses*. SPB Academic, The Hague, The Netherlands.
116. Ludlow, M. M. 1987. Contribution of Osmotic Adjustment to the Maintenance of Photosynthesis during Water Stress. *Progress in photosynthesis research*:161–168.
117. Luo, N., J. Liu, X. Yu, and Y. Jiang. 2011. Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 141:19–29.
118. Mackay, T. F. C. 2001. The genetic architecture of quantitative traits. *Annu. Rev. Genet* 35:303–39.
119. Mammadov, J., R. Aggarwal, R. Buyyarapu, and S. Kumpatla. 2012. SNP markers and their impact on plant breeding. *International Journal of Plant Genomics* 2012.
120. May, G. D., and R. A. Dixon. 2004. Quick guide *Medicago truncatula*. *Current Biology* 14:180–181.
121. McNally, K. L., K. L. Childs, R. Bohnert, R. M. Davidson, K. Zhao, V. J. Ulat, G. Zeller, R. M. Clark, D. R. Hoen, T. E. Bureau, R. Stokowski, D. G. Ballinger, K. A. Frazer, D. R. Cox, B. Padhukasahasram, C. D. Bustamante, D. Weigel, D. J. Mackill, R. M.

- Bruskiewich, G. R. R. Buell, H. Leung, and J. E. Leach. 2009. Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:12273–8.
122. Meiss, H. 2006. Un point sur l' utilisation de la cartographie des QTL (locus à effet quantitatif) en écologie évolutive.
123. Menguer, P. K., R. A. Sperotto, and F. K. Ricachenevsky. 2017. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. *Genetics and Molecular Biology* 40:238–252.
124. Merchan, F., L. de Lorenzo, S. G. Rizzo, A. Niebel, H. Manyani, F. Frugier, C. Sousa, and M. Crespi. 2007. Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 51:1–17.
125. Miklas, P. N., J. D. Kelly, S. E. Beebe, and M. W. Blair. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147:105–131.
126. Mohammadi, M., a Taleei, H. Zeinali, and M. Naghavi. 2005. QTL analysis for phenologic traits in doubled haploid population of barley. *Int J Agric*:820–823.
127. Mohan, M., S. Nair, a Bhagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C. R. Bhatia, and S. Takuji. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3:87–103.
128. Moreau, D., C. Salon, and N. Munier-Jolain. 2006. Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: An effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant, Cell and Environment* 29:1087–1098.
129. Moreau, D., C. Salon, and N. Munier-Jolain. 2007. A model-based framework for the phenotypic characterization of the flowering of *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment* 30:213–224.
130. Morgante, M., and F. Salamini. 2003. From plant genomics to breeding practice. *Current Opinion in Biotechnology* 14:214–219.
131. Mouhouche, B., F. Ruget, and R. Delécolle. 1998. Effects of water stress applied at different phenological phases on yield components of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 18:197–205.
132. Mousseau, T. A., and D. A. Roff. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* 59 (Pt 2):181–197.

133. Mylona, P., K. Pawlowski, and T. Bisseling. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant cell* 7:869–885.
134. Novak, K., E. Biedermannova, and J. Vondrys. 2015. Functional markers delimiting a *Medicago ortholoue* of pea symbiotic gene NOD3. *Euphytica* 186:761–777.
135. Nunes, C., S. de Sousa Araújo, J. M. da Silva, M. P. S. Fevereiro, and A. B. da Silva. 2008. Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. Jemalong to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 63:289–296.
136. Okono, A., P. Monneveux, and J. . Ribault. 2013. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 4:1–2.
137. Van Ooijen, J. W. 2006. JoinMap ® 4. JoinMap:Software for the calculation of genetic linkage ma.
138. Orr, H. A. 2010. Fitness and its role in evolutionary genetics H. *Nat Rev Genet* 10:531–539.
139. Pace, C. De, L. Ricciardi, A. Kumar, S. Pavan, C. Lotti, S. Dixit, and C. Emani. 2013. Identification of Traits, Genes, and Crops of the Future. Pages 27–177 *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops*.
140. Passioura, J. B. 2006. The perils of pot experiments. *Functional Plant Biology* 33:1075–1079.
141. Pelletier, G. 2013. Comment la génétique pourra contribuer à l'adaptation des plantes au déficit hydrique. <https://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/295585-454ef-resource-revue-de-l-academie-d-agriculture-plantes-et-secheresse.html>.
142. Pennypacker, B. W., K. T. Leath, W. L. Stout, and R. R. Hill. 1990. Technique for simulating field drought stress in the greenhouse. *Agronomy journal* 82:951–957.
143. Perrin, R. M., and M. L. Phillips. 1978. Some Effects of Mixed Cropping on the Population Dynamics of Insect Pests. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24:585–593.
144. Pierre, J.-B. 2008. Recherche de déterminants génétiques de la date de floraison chez la Légumineuse modèle, *Medicago truncatula*.
145. Pierre, J.-B., T. Huguet, P. Barre, C. Huyghe, and B. Julier. 2008. Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 117:609–620.
146. Plaut, Z. 2003. Plant exposure to water stress during specific growth stages.
147. Podlich, D. W., C. R. Winkler, and M. Cooper. 2004. Mapping As You Go. An Effective

- Approach for Marker Assisted Selection of Complex Traits. *Crop Science* 44:1560–1571.
148. Poormohammad Kiani, S. 2007. Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol (*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse , These de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
 149. Poormohammad Kiani, S., P. Maury, L. Nouri, N. Ykhlef, P. Grieu, and A. Sarrafi. 2009. QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding* 128:363–373.
 150. Poorter, H., F. Fiorani, M. Stitt, U. Schurr, A. Finck, Y. Gibon, B. Usadel, R. Munns, O. K. Atkin, F. Tardieu, and T. L. Pons. 2012. The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. *Functional Plant Biology* 39:821–838.
 151. Prasanna, B. M. 2012. Diversity in global maize germplasm: Characterization and utilization. *Journal of Biosciences* 37:843–855.
 152. Prosperi, J., I. Oliviers, M. Angevain, and G. G. P. Nansat. 1993. Diversité Génétique , Conservation Et Utilisation Des Ressources Génétiques Des Luzernes Méditerranéennes. *Courrier de l'environnement de l'INRA. Sauve qui peut n°4 (S4)*. pp.17-24.
 153. Quarrie, S. a., S. Pekic Quarrie, R. Radosevic, D. Rancic, a. Kaminska, J. D. Barnes, M. Leverington, C. Ceoloni, and D. Dodig. 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: From the QTL to candidate genes. *Journal of Experimental Botany* 57:2627–2637.
 154. R Development Core Team, R. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
 155. Rasmussen, S., P. Barah, M. C. Suarez-Rodriguez, S. Bressendorff, P. Friis, P. Costantino, A. M. Bones, H. B. Nielsen, and J. Mundy. 2013. Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 161:1783–94.
 156. Ribaut, J. M., M. Banziger, J. Betran, C. Jiang, G. O. Edmeades, K. Dreher, and D. Hoisington. 2002. Use of molecular markers in plant breeding: drought tolerance improvement in tropical maize. Pages 85–99 *Quantitative genetics, genomics, and plant breeding*.
 157. Rispaill, N., P. Kaló, G. B. Kiss, T. H. N. Ellis, K. Gallardo, R. D. Thompson, E. Prats, E. Larrainzar, R. Ladrera, E. M. González, C. Arrese-Igor, B. J. Ferguson, P. M. Gresshoff, and D. Rubiales. 2010. Model legumes contribute to faba bean breeding. *Field Crops Research* 115:253–269.
 158. Rizhsky, L., H. Liang, J. Shuman, V. Shulaev, S. Davletova, R. Mittler, Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., and M. R. 2004. When Defense Pathways

- Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology* 134:1683–1696.
159. Roldan, D. L. 2011. Détection de QTL : interaction entre dispositif expérimental et méthodes statistiques. These de Doctorat de l'Université de Toulouse.
160. Ronfort, J., T. Bataillon, S. Santoni, M. Delalande, J. L. David, and J.-M. Prospero. 2006. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC plant biology* 6:28.
161. Roux, F., P. Touzet, J. Cuguen, and V. Le Corre. 2006. How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends in plant science* 11:375–81.
162. Sakai, H., and T. Itoh. 2010. Massive gene losses in Asian cultivated rice unveiled by comparative genome analysis. *BMC Genomics* 11:121.
163. Salvi, S., and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: Present and future challenges. *Trends in Plant Science* 10:297–304.
164. Santoni, S., P. Faivre-Rampant, E. Prado, and D. Prat. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures* 9:311–327.
165. Seneviratne, S. I., N. N. Nicholls, D. Easterling, C. Goodess, S. Kanae, J. Kossin, Y. Luo, J. Marengo, K. McInnes, M. Rahimi, M. Reichstein, A. Sorteberg, C. Vera, and X. Zhang. 2012. Changes in climate extremes and their impacts on the natural physical environment. Chapter 3. IPCC Special Report on Extreme Events and Disasters (SREX):1–143.
166. Singh, D., C. Kumar, J. Taunk, R. Sewak, and S. Tomar. 2016. Genetic analysis and molecular mapping of seedling survival drought tolerance gene in lentil (*Lens culinaris Medikus*). *Molecular Breeding* 36:1–12.
167. Singh, R., P. Sharma, R. K. Varshney, S. K. Sharma, and N. K. Singh. 2008. Chickpea improvement: Role of wild species and genetic markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25:267–314.
168. Siol, M., J. M. Prospero, I. Bonnin, and J. Ronfort. 2008. How multilocus genotypic pattern helps to understand the history of selfing populations: a case study in *Medicago truncatula*. *Heredity* 100:517–25.
169. Skirycz, A., K. Vandenbroucke, P. Clauw, K. Maleux, B. De Meyer, S. Dhondt, A. Pucci, N. Gonzalez, F. Hoerberichts, V. B. Tognetti, M. Galbiati, C. Tonelli, F. Van Breusegem, M. Vuylsteke, and D. Inzé. 2011. Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nature biotechnology* 29:212–214.

170. Sletvold, N. 2012. Variation in tolerance to drought among Scandinavian populations of *Arabidopsis lyrata*. *Evolution Ecology* 26:559–577.
171. Small, E. 2011. Alfalfa and relatives. *Evolution and classification of Medicago*. Page (NRC Research Press, Ed.). Ottawa.
172. Smith, M. 1992. CROPWAT : un logiciel pour la planification et la gestion des systèmes d'irrigation. *Bulletin FAO d'Irrigation et de Drainage* 46:133.
173. Soller, M., T. Brody, and A. Genizi. 1976. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 47:35–39.
174. Steele, K. A., A. H. Price, H. E. Shashidhar, and J. R. Witcombe. 2006. Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theoretical and Applied Genetics* 112:208–221.
175. Stoker, R. 1974. Effect on dwarf beans of water stress at different phases of growth. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 2:13–15.
176. Talamé, V., M. C. Sanguineti, E. Chiapparino, H. Bahri, M. Ben Salem, B. P. Forster, R. P. Ellis, S. Rhouma, W. Zoumarou, R. Waugh, and R. Tuberosa. 2004. Identification of *Hordeum spontaneum* QTL alleles improving field performance of barley grown under rainfed conditions. *Annals of Applied Biology* 144:309–319.
177. Tanksley, S. D., and J. C. Nelson. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics* 92:191–203.
178. Tardieu, F. 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience* 337:57–67.
179. Tardieu, F., B. Parent, C. F. Caldeira, and C. Welcker. 2014. Genetic and physiological controls of growth under water deficit. *Plant physiology* 164:1628–35.
180. Tattini, M., and F. Loreto. 2014. Plants in Mediterranean areas: “Living in the sun.” *Environmental and Experimental Botany* 103:1–2.
181. Thoquet, P., M. Ghérardi, E. Journet, A. Kereszt, J. Ané, J. Prosperi, and T. Huguet. 2002. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula* : an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes 13:1–13.
182. Tuberosa, R. 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Annals of Botany* 89:941–963.

183. Tuberosa, R. 2012. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Frontiers in Physiology* 3 SEP:1–26.
184. Tuberosa, R., and S. Salvi. 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in plant science* 11:405–412.
185. Tuteja, N., and S. S. Gill. 2013. *Plant Acclimation to Environmental Stress*.
186. Valkoun, J. J. 2001. Wheat pre-breeding using wild progenitors. *Euphytica* 119:17–23.
187. Vandecasteele, C., B. Teulat-merah, M. M. Paven, O. Leprince, B. L. Y. Vu, L. Viau, L. Ledroit, S. Pelletier, N. Payet, P. Satour, C. Lebras, K. Gallardo, T. Huguet, A. M. Limami, J. Prospero, and J. Buitink. 2011. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose / raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*:1473–1487.
188. Vargas, M., F. A. Van Eeuwijk, J. Crossa, and J. M. Ribaut. 2006. Mapping QTLs and QTL x environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1009–1023.
189. Varshney, R. K., M. Thudi, S. N. Nayak, P. M. Gaur, J. Kashiwagi, L. Krishnamurthy, D. Jaganathan, J. Koppolu, A. Bohra, S. Tripathi, A. Rathore, A. K. Jukanti, V. Jayalakshmi, A. Vemula, S. J. Singh, M. Yasin, M. S. Sheshshayee, and K. P. Viswanatha. 2014. Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 127:445–62.
190. Vaughn, J. N., R. L. Nelson, Q. Song, P. B. Cregan, and Z. Li. 2014. The Genetic Architecture of Seed Composition in Soybean Is Refined by Genome-Wide Association Scans Across Multiple Populations. *G3 Bethesda* 4:2283–2294.
191. Verhoeven, K. J. F., T. K. Vanhala, A. Biere, E. Nevo, and J. M. M. van Damme. 2004. The genetic basis of adaptive population differentiation: a quantitative trait locus analysis of fitness traits in two wild barley populations from contrasting habitats. *Evolution; international journal of organic evolution* 58:270–283.
192. Verslues, P. E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu, and J. K. Zhu. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* 45:523–539.
193. De Vienne. 1998. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. INRA. Nancy.
194. Vinocur, B., and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology* 16:123–32.

195. Volis, S., D. Ormanbekova, and K. Yermekbayev. 2015. Role of phenotypic plasticity and population differentiation in adaptation to novel environmental conditions. *Ecology and Evolution* 17:3818–3829.
196. Voorrips, R. E. 2002. Computer Note MapChart : Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 93:77–78.
197. Wang, H. L., and M. A. Grusak. 2005. Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. *Annals of Botany* 95:737–747.
198. Wehner, G. G., C. C. Balko, M. M. Enders, K. K. Humbeck, and F. F. Ordon. 2015. Identification of genomic regions involved in tolerance to drought stress and drought stress induced leaf senescence in juvenile barley. *BMC Plant Biology* 15:125.
199. Wood, A. J. 2005. Eco-physiological adaptations to limited water environments. Pages 1–13 in M. A. JENKS and P. M. HASEGAWA, editors. *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing.
200. Yang, S., M. Gao, C. Xu, J. Gao, S. Deshpande, S. Lin, B. A. Roe, and H. Zhu. 2008. Alfalfa benefits from *Medicago truncatula* : The RCT1 gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa. *PNAS* 105:12164–12169.
201. Yordanov, I., V. Velikova, and T. Tsonev. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance *Photosynthetica* 38:171–186.
202. Young, N. D., S. B. Cannon, S. Sato, D. Kim, D. R. Cook, C. D. Town, B. A. Roe, and S. Tabata. 2005. Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 137:1174–1181.
203. Young, N. D., and M. Udvardi. 2009. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current opinion in plant biology* 12:193–201.
204. Young, N., F. Debellé, and G. Oldroyd. 2011. The *Medicago* Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses. *Nature* 480:520–524.
205. Zahaf, O., S. Blanchet, A. De Zélicourt, B. Alunni, J. Plet, C. Laffont, L. De Lorenzo, S. Imbeaud, J. L. Ichanté, A. Diet, M. Badri, A. Zabalza, E. M. González, H. Delacroix, V. Gruber, F. Frugier, and M. Crespi. 2012. Comparative transcriptomic analysis of salt adaptation in roots of contrasting *medicago truncatula* genotypes. *Molecular Plant* 5:1068–1081.
206. Zhang, J. Y., M. H. Cruz De Carvalho, I. Torres-Jerez, Y. Kang, S. N. Allen, D. V. Huhman, Y. Tang, J. Murray, L. W. Sumner, and M. K. Udvardi. 2014. Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. *Plant, Cell and Environment* 37:2553–2576.

207. Zhou, L., Y. Liu, Z. Liu, D. Kong, M. Duan, and L. Luo. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 61:4157–4168.
208. Zhou, Y., H. M. Lam, and J. Zhang. 2007. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *Journal of Experimental Botany* 58:1207–1217.
209. Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6:66–71.
210. Zorn, A., and M. Lips. 2016. Rentabilité des légumineuses à grains indigènes. 284 *Recherche Agronomique Suisse* 6:284–289.
211. Zou, F., Z. Xu, and T. Vision. 2006. Assessing the significance of quantitative trait loci in replicable mapping populations. *Genetics* 174:1063–1068.

Annexes

Annexe 01: calcul de l'humidité du sol à la capacité de rétention (Cr)

	Poids à la Cr : P	Poids sec : P'	% de l'eau à la Cr
Echantillon 1	164.789	128.450	28.29
Echantillon 2	179.607	136.745	31.34
Echantillon 3	171.547	128.910	33.07
		Moyenne	30.9%

Annexe 02 : Résultats de l'analyse de variance sur les lignées, les traitements et de leurs interactions pour la longueur du rameau principale (essai 2011).

Caractères	Analyse de variance			Moyennes des lignées		(stressé / non stressé)*100
	Traitements	lignées	Traitements x lignées	Non stressé	stressé	
LB0	-	390.14***	-	23,85	-	-
LB1	46.92	291.23***	54.42***	32,57	30,56	93,81%
LB2	1463.70*	382.91***	114.55***	49,15	38,01	77,33%
LB3	6125.5*	576.0***	130.1*	64,51	42,37	65,68%

Annexe 03: Résultats de l'analyse de variance sur les lignées, les traitements et de leurs interactions pour le nombre d'entre nœuds (essai 2011).

Caractères	Analyse de variance			Moyennes des lignées		(stressé / non stressé)*100
	Traitements	Lignées	Traitements x lignées	Non stressé	stressé	
IN0	-	24.60***	-	7,48	-	-
IN1	4.83	6.91**	1.08	9,69	9,08	93,64%
IN2	39.61*	13.95***	3.01***	13,42	11,59	86,40%
IN3	192.66**	7.91**	1.06	16,27	12,49	76,79%

Annexe 04 : Résultats de l'analyse de variance sur les lignées, les traitements et de leurs interactions pour la date de floraison (essai 2011).

Caractères	Analyse de variance			Moyennes des lignées		(stressé / non stressé)*100
	Traitements	Lignées	Traitements x lignées	Non stressé	stressé	
FD	-	113.36***	-	68,05	-	-

Annexe 05 : Résultats de l'analyse de variance sur les lignées, les traitements et de leurs interactions pour les caractères de fitness (essai 2011).

Caractères	Analyse de variance			Moyennes des lignées		(stressé / non stressé)*100
	Traitements	lignées	Traitements x lignées	Non stressé	stressé	
NP3	4849.8*	310.4***	179.5**	32,02	13,58	42,43%
TPN	333704**	13066***	6374**	221,07	63,28	28,63%
TPW	2611.12*	173.66***	84.97***	19,09	4,83	25,31%
MSN	2.30*	14.73***	0.16	7,57	7,16	94,56%
TSNP	20467998**	954929***	586633***	1692,13	440,15	26,01%
MPW	0.000073	0.0058***	0.00039*	0,08	0,08	95,65%

Annexe 06 : Taux de réduction entre les deux conditions chez les différents génotypes pour les différents caractères étudiés (essai 2011).

Lignée	LB1	IN1	LB2	IN2	LB3	IN3	NP3	TPN	TPW	MSN	TSNP	MPW
A10	-1%	-1%	10%	8%	22%	21%	52%	58%	49%	1%	58%	-19%
A17	-18%	2%	12%	14%	33%	23%	63%	68%	72%	7%	70%	12%
ALG423-406	15%	10%	27%	21%	36%	26%	65%	72%	76%	2%	73%	14%
DZA315.16	8%	17%	30%	20%	35%	27%	58%	71%	79%	6%	73%	22%
F83005.5	6%	7%	17%	12%	28%	22%	60%	65%	66%	12%	69%	5%
F83005.9	16%	8%	36%	23%	42%	29%	-2%	74%	73%	1%	75%	-7%
TN1.11	29%	16%	38%	17%	47%	29%	77%	83%	80%	10%	85%	-18%
TN1.21	24%	12%	38%	20%	43%	18%	65%	75%	84%	4%	76%	37%
TN6.18	-49%	-11%	-25%	-10%	10%	24%	56%	54%	65%	2%	56%	24%
TN8.3	-5%	-2%	12%	4%	31%	13%	50%	73%	68%	5%	75%	20%
Moyenne	2%	6%	20%	13%	33%	23%	54%	69%	71%	5%	71%	5%

Annexe 07 : Caractères mesurés avant l'application du stress hydrique, comparaison entre parents et héritabilité (2013, 2014).

Caractères	Année	TN1.11	A17	Moyenne Parents	Moyenne RIL	Intervalle des valeurs	H ²
WV	2013	2,536	2,679	2,607	2,398	0.82 - 4.14	0.42
	2014	3.17*	3,786	3,482	3,558	1.23 - 5.23	0.19
SV	2013	3,107	3,321	3,214	3,482	41821,000	0.22
	2014	4,286	4,821	4,554	4,519	2.52 - 6.14	0.26
LB0	2013	4.21***	7,679	5,946	6,567	1.02 - 19.49	0.49
	2014	6.75*	8,161	7,455	7,575	2.55 - 12.71	0.16
IN0	2013	4,607	4,714	4,661	4,715	2.18 - 6.68	0.34
	2014	9,071	8,500	8,786	8,370	5.52 - 10.77	0.23
NB	2013	3,964	3,929	3,946	4,177	2.03 - 7.22	0.25
	2014	5,929	5,964	5,946	5,947	3.96 - 7.9	0.17
FD	2013	64.07**	60,214	62,143	61,640	53.05 -75.05	0.34
	2014	61.46***	65,500	63,482	65,893	54.9 - 81.4	0.66
SP	2013	17.19*	17,196	17,196	16,938	7.54 - 43.54	0.57
	2014	-	-	-	-	-	-

**Annexe 08 : Caractères mesurés après l'application du stress hydrique,
comparaison entre les deux situations hydrique pour chaque parent (2013, 2014).**

Caractères	Année	Irrigué (r)		Stressé (s)		Irrigué (r)	Stressé (s)	MPs/MPr	TNs/TNr (x100)	A17s/A17r (x100)
		TN1.11	A17	TN1.11	A17	Moy-parents (MPr)	Moy-parents (MPs)			
MSW	2013	4,96	4,87	4,02	3,87	4,91	3,94***	80,35	81,10	79,58
	2014	4,58	4,42	4,34	4,07	4,50	4,20**	93,45	94,79	92,06
MSN	2013	9,17	9,57	8,07	7,14	9,37	7,60**	81,20	88,05	74,63
	2014	11,10	10,59	8,83	8,52	10,85	8,67***	80,02	79,61	80,45
TPN	2013	67,79	59,50	46,07	33,21	63,64	39,64***	62,29	67,97	55,82
	2014	95,64	96,07	59,64*	69,86	95,86	64,75***	67,55	62,36	72,71
TPW	2013	12.05**	7,85	7.47**	4,16	9,95	5,81***	58,48	62,01	53,05
	2014	17.21**	14,74	10.17**	9,24	15,97	9,70***	60,78	59,12	62,71
MPW	2013	0.21***	0,17	0.27***	0,17	0,19	0,19 Ns	99,11	98,40	99,96
	2014	0.20***	0,18	0.17***	0,13	0,19	0,15***	81,59	86,79	75,71
LB3	2013	53.57*	59,50	51,79	53,14	56,54	52,46Ns	92,80	96,67	89,32
	2014	50.00*	56,14	43,79	46,29	53,07	45,03***	84,86	87,57	82,44
TWSP	2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2014	50.62*	46,52	38.42*	34,50	48,57	36,46***	75,07	75,92	74,16

**Annexe 9 : Caractères mesurés après l'application du stress hydrique,
comparaison entre les RIL dans les deux situations hydrique et valeurs d'héritabilité (2013, 2014).**

Caractères	Année	Irrigué (r)		Stressé (s)		RILs/RILr (x100)	H ² (Irrigué)	H ² (stressé)
		Moyenne RIL	Intervalle	Moyenne RIL	Intervalle des valeurs			
MSW	2013	4,81	2.42 - 8.65	4,08	2.54 - 6.63	84,83	0.28	0.45
	2014	4,51	3.42 - 6.47	4,24	2.99 - 5.77	94,17	0.23	0.23
MSN	2013	9,24	5.17 - 12.64	7,67	3.07 - 11.01	83,00	0.24	0.13
	2014	10,46	5.97 - 13.67	8,28	3.77 - 11.2	79,12	0.31	0.36
TPN	2013	60,37	8.46 - 129.96	38,47	1.27 - 94.77	63,73	0.42	0.35
	2014	98,41	54.66 - 162.53	63,61	23.11 - 98.06	64,64	0.39	0.38
TPW	2013	9,21	0.17 - 18.42	5,54	0.01 - 11.79	60,19	0.28	0.26
	2014	16,02	11.93 - 22.09	9,27	3.75 - 13.78	57,87	0.18	0.16
MPW	2013	0,20	0.11 - 0.31	0,18	0.1 - 0.31	93,68	0.53	0.31
	2014	0,19	0.1 - 0.27	0,15	0.08 - 0.25	78,72	0.47	0.43
LB3	2013	54,26	26.73 - 81.88	51,09	26.63 - 72.77	94,16	0.33	0.52
	2014	50,63	32.87 - 72.62	45,17	27.68 - 67.3	89,20	0.28	0.38
TWSP	2013	-	-	-	-	-	-	-
	2014	46,97	31.51 - 70.55	35,26	15.04 - 53.91	75,08	0.17	0.15

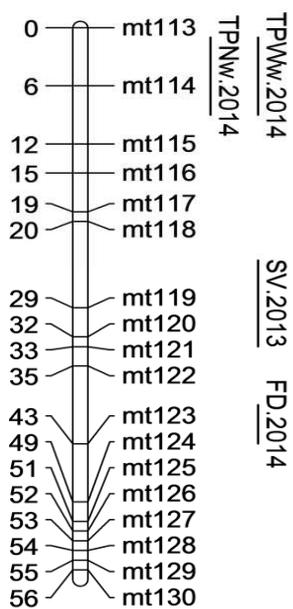
Annexe 10 : Corrélation entre caractères mesurés en conditions irriguées et en stressées (2011)

Caractère	Année 2011
LB3	0.796**
IN3	0.772**
NP3	0.853**
TPN	0.718*
TPW	0.812**
MSN	0.987***
TSNP	0.759*
*, ** et ***: significatif à 0.05, 0.01 et 0.001 respectivement	

Annexe 11 : Corrélation entre caractères mesurés en conditions irriguées et en stressées (2013-2014)

Caractère	Année	
	2013	2014
MSW	0.25**	0.26**
MSN	-0.06 ^{NS}	0.41***
TPN	0.58***	0.20*
TPW	0.47***	0.23**
MPW	0.45***	0.43***
LB3	0.33***	0.37***
TWSP	-	0.41***
NS : non significatif à P = 0.05 *, ** et ***: significatif à 0.05, 0.01 et 0.001 respectivement		

Chr 7



LB3w,2013
 MSWs,2014
 MSWw,2014
 TPWW,2013
 TPNW,2014
 TWSPw,2014
 TPVs,2013
 TPNw,2013
 LB0,2013
 FD,2013
 TPNs,2013
 MPWw,2013

Chr 8

