

**ANNIE CLAESSENS**

**CARACTÉRISATION DE POPULATIONS DE LUZERNE SÉLECTIONNÉES POUR LA  
TOLÉRANCE AU GEL**

**Mémoire  
Présenté  
À la Faculté des études supérieures  
De l'Université Laval  
Pour l'obtention  
Du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)**

**Département de phytologie  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL**

**MAI 1998**

**© Annie Claessens, 1998**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

0-612-33598-4

## AVANT-PROPOS

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de maîtrise, le Dr. Guy Allard du Département de Phytologie de l'Université Laval à Ste-Foy, pour la réalisation de ce mémoire, sa disponibilité et sa gentillesse ainsi qu'au Dr. Réal Michaud de la Station de Recherche d'Agriculture et d'Agroalimentaire Canada à Ste-Foy, pour ses conseils de grande valeur, sa disponibilité, ses encouragements, la confiance qu'il a eu en moi et son soutien financier au cours des deux dernières années. Je remercie également le Dr. Paul Nadeau ainsi que le Dr. Yves Castonguay, chercheurs à la Station de Recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Ste-Foy, pour leur disponibilité, leurs encouragements et leur aide lors de la réalisation des expériences et de la préparation de ce mémoire.

Je tiens à remercier M. Pierre Lechasseur, Mme. Lucette Chouinard et M. Antoine Chabot pour l'aide technique précieuse qu'ils m'ont apportée pendant mes travaux, pour leur amitié et leurs encouragements.

Je remercie les autorités de la Station de Recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Ste-Foy, pour l'espace et le matériel qu'ils ont mis à ma disposition, M. André Lévesque et M. Martin Brown pour l'aide technique en informatique et tout le personnel de la Station pour leur disponibilité et leur gentillesse.

## RÉSUMÉ

Des plantes de luzerne (cv Apica) ont été soumises à deux cycles de sélection composés chacun de trois stress de congélation successifs réalisés, sous des conditions contrôlées. À la fin de chaque cycle, les génotypes les plus performants ont été sélectionnés et intercroisés. On a ainsi généré deux populations de tolérance au froid potentiellement supérieure : TF1 et TF2. Le cv Apica, ainsi que les deux populations dérivées de la sélection ont été évalués pour leur tolérance au gel ( $TL_{50}$ ), l'accumulation des sucres cryoprotecteurs et l'expression de deux gènes régulés par le froid. La sélection sous des stress successifs de congélation a augmenté significativement la tolérance au gel. Apica, TF1 et TF2 ont différencié significativement en ce qui concerne l'accumulation des oligosaccharides de la série du raffinose lors de l'échantillonnage de mi-hiver. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans l'expression des gènes activés par le froid.

Directeur de Recherche  
Réal Michaud

Candidate  
Annie Claessens

## TABLE DES MATIÈRES

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>I</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I - REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>3</b>
1.1 La survie à l'hiver .....	3
1.1.1 Les agressions environnementales .....	3
1.1.1.1 Les facteurs abiotiques .....	3
1.1.1.2 Les facteurs biotiques .....	5
1.1.2 La gestion.....	7
1.2 Les dommages causés par le gel .....	10
1.3 La tolérance au gel .....	11
1.4 Les changements biochimiques.....	12
1.4.1 Les hydrates de carbones.....	13
1.4.1.1 L'amidon.....	13
1.4.1.2 Le saccharose.....	13
1.4.1.3 Les oligosaccharides .....	15
1.4.2 L'expression génétique.....	17
1.4.2.1 Les gènes régulés par le froid .....	18
1.5 L'amélioration de la tolérance au gel.....	19
1.5.1 La sélection au champ basée sur la survie à l'hiver .....	20
1.5.2 Les tests de congélation.....	20
1.5.3 Les marqueurs biochimiques.....	21
1.6 Objectifs.....	21
<b>CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>22</b>
2.1 Méthode de sélection.....	22
2.2 Caractérisation des populations TF1 et TF2 .....	23
2.2.1 Évaluation au champ .....	24

2.2.1.1	Dormance.....	24
2.2.1.2	Survie à l'hiver .....	25
2.2.2	Évaluation en serre non chauffée et en aire de propagation .....	26
2.2.2.1	Survie et matière sèche .....	28
2.2.2.2	Tolérance au gel (TL <sub>50</sub> ) .....	28
2.2.2.3	Hydrates de carbone .....	29
2.2.2.4	Expression génétique .....	31
2.3	Analyses statistiques .....	32
<b>CHAPITRE III - RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>33</b>
3.1	Conditions climatiques.....	33
3.2	Expérience au champ .....	35
3.2.1	Dormance .....	35
3.2.2	Survie à l'hiver .....	36
3.3	Expérience en serre non chauffée .....	39
3.3.1	Survie.....	39
3.3.2	Tolérance au gel (TL <sub>50</sub> ).....	41
3.3.3	Hydrates de carbones.....	45
3.3.3.1	Amidon .....	45
3.3.3.2	Saccharose .....	45
3.3.3.3	Oligosaccharides de la famille du raffinose.....	47
3.3.3.4	Glucose .....	50
3.3.3.5	Fructose.....	50
3.3.4	Expression génétique.....	52
3.4	Expérience en aire de propagation .....	54
3.4.1	Résultats du prélèvement foliaire .....	54
3.4.1.1	Hydrates de carbones .....	54
3.4.1.2	Expression génétique .....	57
3.4.2	Résultats du prélèvement au niveau des collets. ....	60
3.4.2.1	Hydrates de carbone .....	60
3.4.2.2	Expression génétique .....	62
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>67</b>
<b>ANNEXE.....</b>		<b>81</b>

## **LISTE DES FIGURES**

- Figure 1. Évolution des températures moyennes de l'air (°C), de l'accumulation de neige (cm) et des précipitations sous formes de pluie (mm) au cours de l'hiver 1996-97 à deux stations météorologiques d'Environnement Québec soit Beauséjour et Laurierville qui sont situées respectivement près des sites de St-David et de Plessisville. 34
- Figure 2. Pourcentage de survie de 90 plantes du cv Apica et de chacune des populations TF1 et TF2 lors de cinq dates d'échantillonnage. 40
- Figure 3. Regain en g de poids sec (PS) par pot déterminé après 3 semaines de repousse pour les plantes acclimatées en serre non chauffée. Les erreur-types sont indiquées (n=6). 40
- Figure 4. Tolérance au gel du cv Apica et des populations sélectionnées TF1 et TF2. La tolérance au gel est exprimée par la  $TL_{50}$  soit la température à laquelle 50% de la population est détruite. Les intervalles de confiance ont une probabilité de 95%. 41
- Figure 5. Regain après 3 semaines de repousse pour les plantes endurcies en serre non chauffée et qui ont subi un test de congélation (hiver 1996-97). Données combinées pour l'ensemble des températures à chacun des tests de congélation. 43
- Figure 6. Regain par échantillonnage après 3 semaines de repousse pour les plantes endurcies en serre non chauffée et qui ont subi un test de congélation (hiver 1996-97). Les erreurs-types sont indiquées. 44

- Figure 7. Évolution des niveaux d'amidon et de saccharose dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4). 46
- Figure 8. Évolution des niveaux de stachyose et de raffinose dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4). 49
- Figure 9. Évolution des niveaux de glucose et de fructose dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4). 51
- Figure 10. Expression des gènes msaCIA et msaCIC dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4). 53
- Figure 11. Teneur en sucres solubles au niveau foliaire chez le cv Apica et les populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=100). 55
- Figure 12. Distribution de 100 génotypes du cv Apica et de 100 génotypes pour chacune des populations TF1 et TF2 en fonction du contenu en raffinose et en saccharose dans la partie foliaire. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines. 56
- Figure 13. Expression des gènes msaCIA et msaCIC au niveau foliaire chez le cv Apica et les populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=100). 58
- Figure 14. Distribution de 100 génotypes du cv Apica et de 100 génotypes pour chacune des populations TF1 et TF2 en fonction de l'expression des gènes msaCIA et msaCIC au niveau foliaire. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines. 59

Figure 15. Teneur en hydrates de carbone dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines et à -2°C pendant une période additionnelle de 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=7). 61

Figure 16. Expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines et à -2°C pendant une période additionnelle de 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=7). 63

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Dormance automnale de six cultivars et deux populations de luzerne établis à St-David en 1996. Les cultivars et les populations sont classés selon la hauteur moyenne des plantes en cm (HMP) et un indice de dormance automnale (IDA). 37
- Tableau 2. Dormance automnale de six cultivars et deux populations de luzerne établis à Plessisville en 1996. Les cultivars et les populations sont classés selon la hauteur moyenne des plantes en cm (HMP) et un indice de dormance automnale (IDA). 37
- Tableau 3. Survie à l'hiver de six cultivars et deux populations de luzerne établis à St-David en 1996-97. Les cultivars et les populations sont classés selon le pourcentage moyen de survie à l'hiver (PMSH) et un indice de dommages (ID). 38

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AEDT	Acide éthylène-diaminetetraacétique
ADN	Acide desoxyribonucléique
APHBA	Acide p-hydroxy-benzoïque hydrazide
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CPM	Compte par minute
cv	Cultivar
DSS	Dodecyl sulfate de sodium
GS	Enzyme galactinol synthase
HMP	Hauteur moyenne des plantes
ID	Indice de dommages
IDA	Indice de dormance automnale
K	Potassium
Log	Logarithmique
M : C : E	Méthanol-Chloroforme-Eau
MLG	Modèle linéaire général
n	Nombre
P	Phosphore
P <sup>32</sup>	Phosphore radioactif
PMSH	Pourcentage moyen de survie à l'hiver
PPDS	Plus petite différence significative
PS	Poids sec

<b>p/v</b>	<b>Poids / volume</b>
<b>SAS</b>	<b>Système d'analyse statistique</b>
<b>SPS</b>	<b>Enzyme saccharose-phosphate synthase</b>
<b>SS</b>	<b>Enzyme saccharose synthase</b>
<b>SSC</b>	<b>Sel de trisodium citrate</b>
<b>TE</b>	<b>10 mM Tris-HCl à pH 7.4, 1mM AEDT</b>
<b>TF</b>	<b>Tolérance au froid</b>
<b>TF1</b>	<b>Tolérance au froid après 1 cycle de sélection</b>
<b>TF2</b>	<b>Tolérance au froid après 2 cycles de sélection</b>
<b>TL<sup>50</sup></b>	<b>Température létale pour 50% de la population</b>
<b>TLE</b>	<b>200mM tris-HCl à pH 8.0, 100mM LiCl, 5mM AEDT</b>
<b>v/v</b>	<b>Volume / volume</b>

## INTRODUCTION

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est la légumineuse fourragère la plus cultivée en Amérique du Nord. Ceci est attribuable à ses nombreuses qualités agronomiques : son rendement élevé en matière sèche, son excellente valeur alimentaire, sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et celle d'améliorer la structure du sol (Barnes *et al.*, 1988).

La luzerne cultivée en semis pur ou en mélange occupait, en 1994, 80% des superficies en foin dans les grands états laitiers du Midwest américain (USDA, 1994). En 1996, cette proportion était de 58% au Canada et seulement de 24% au Québec (Statistique Canada, 1997). La faible utilisation de la luzerne au Québec est en grande partie attribuable à son manque de persistance sous nos conditions de climat froid et humide ainsi qu'à une qualité insuffisante des sols (mauvais drainage, bas pH). L'amélioration de la persistance des cultivars à haute valeur agronomique permettrait d'accroître la culture de la luzerne sous nos conditions de production, de diminuer le coût relié à la réimplantation hâtive suite à des dommages hivernaux importants, ainsi qu'à l'achat de suppléments pour l'alimentation animale.

La survie à l'hiver de la luzerne est déterminée par plusieurs facteurs incluant le gel, les maladies, les insectes, la fertilisation, l'humidité du sol et la régie de coupe. Ce phénomène est donc très complexe. Cependant, parmi tous les facteurs impliqués dans la persistance de cette légumineuse, la tolérance aux basses températures est le facteur qui a le plus d'impact dans

nos régions (McKenzie *et al.*, 1988). Il a été démontré que les cultivars de luzerne ont la capacité génétique d'augmenter significativement leur tolérance au gel indépendamment de leur potentiel de survie à l'hiver (Castonguay et Guckert, 1996). Par contre, ces cultivars n'atteignent pas tous le même niveau de tolérance, ce qui révèle l'existence d'une variabilité pour ce caractère. Le développement de cultivars ayant une tolérance accrue au gel dépend de l'identification précise de génotypes ayant un potentiel génétique supérieur pour ce caractère.

Au Centre de Recherche et de Développement sur les sols et les grandes cultures d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, une nouvelle méthode de sélection, basée sur l'application de stress successifs de congélation a été mise à l'essai. Pour ce faire, des plantes (1500) du cv Apica ont été soumises à deux cycles de sélection à raison de trois stress de congélation successifs par cycle (sous des conditions contrôlées). Les génotypes les plus performants, à chacun des deux cycles, ont été intercroisés pour générer deux populations de tolérance au gel potentiellement supérieure : TF1 et TF2.

Ce projet de recherche vise à vérifier l'efficacité de cette méthode de sélection et d'évaluer l'effet indirect de la sélection sur d'autres caractères reliés à la tolérance au gel. Les trois populations ont donc été caractérisées en fonction de leur tolérance au gel ( $TL_{50}$ ), de leur teneur en sucres cryoprotecteurs, de l'expression de certains gènes régulés par le froid et de leur survie à l'hiver.

# CHAPITRE I

## REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1 La survie à l'hiver

La survie à l'hiver reflète la capacité des plantes à tolérer une série d'agressions de toute nature (Steponkus, 1978). Plusieurs types d'agressions peuvent causer un stress à la plante : le gel, les maladies, les insectes, une mauvaise fertilisation, un mauvais drainage, etc. De plus, le fait qu'une plante soit tolérante à un stress ne signifie pas qu'elle soit tolérante à d'autres stress. Cela implique que lors de la sélection, il faut tenir compte de plusieurs facteurs influençant la survie à l'hiver de la plante (Bowley et McKersie, 1990 ; McKersie et Hunt, 1987). Le problème de la persistance et de la survie à l'hiver de la luzerne est donc très complexe.

#### 1.1.1 Les agressions environnementales

##### 1.1.1.1 Les facteurs abiotiques

La survie de la luzerne dépend en grande partie de sa capacité à répondre à des facteurs climatiques pendant les phases critiques de son cycle vital (Ouellet, 1977). Les facteurs abiotiques les plus importants en ce qui a trait à la survie à l'hiver des légumineuses

fourragères sont : les températures gélives, la présence d'une couverture de neige, l'humidité du sol, ainsi que l'alternance de gel et de dégel.

### Les températures gélives

L'exposition directe à des températures gélives peut causer des dommages considérables aux plantes (Andrews, 1987). De tels dommages peuvent modifier la tolérance des plantes face à d'autres stress ou même les détruire. La luzerne, lorsqu'endurcie, peut supporter des températures allant jusqu'à  $-25^{\circ}\text{C}$  pendant quelques heures (Paquin, 1984). Cependant, les plantes peuvent subir des dommages importants lorsqu'elles sont maintenues pour une longue période à des températures plus modérées ( $-8$  à  $-10^{\circ}\text{C}$ ). Chez la luzerne, seules les racines, qui sont protégées sous la surface du sol et les collets, sont vivaces. Les températures minimales à la surface du sol ou dans les couches superficielles sont donc déterminantes en regard de la survie à l'hiver des plantes. L'isolation thermique de ces dernières contre les basses températures accroît leurs chances de survie. L'effet isolant de la neige et du couvert végétal permet de protéger partiellement les plantes contre les basses températures.

### Les précipitations

Pendant la saison hivernale, les sols n'arrivent souvent pas à éliminer le surplus d'eau apporté par les dégels successifs ou par les fortes pluies (Pesant *et al.*, 1978). Ceci entraîne la formation d'une couche de glace à la surface du sol. Ce phénomène peut causer l'asphyxie des racines de luzerne. L'absence d'oxygène favorise la glycolyse anaérobique et l'accumulation de ses sous produits toxiques tels que  $\text{CO}_2$ , éthanol, acide lactique et acétylène (Barta, 1980). De plus, la glace possède une conductivité thermique élevée ce qui peut accroître les dommages causés par le gel en abaissant la température du sol. Tout ce qui peut contribuer à empêcher la glace d'établir un contact direct avec le sol et la plante et à pourvoir des espaces pour la diffusion des gaz (ex. : la neige et la végétation) permet de réduire les dommages. Les précipitations sous forme de neige contribuent donc à accroître la survie à l'hiver des plantes puisque la couverture nivale permet de maintenir les

températures du sol près du point de congélation. L'épaisseur de la couche de neige est donc très importante, car elle protège les collets ainsi que les racines contre le gel. Selon Paquin (1984), si la couche de neige est insuffisante, le gel est la cause première de mortalité chez la luzerne. L'humidité du sol peut également retarder la reprise de la croissance au printemps puisque le réchauffement d'un sol dépend de la température ambiante et de son contenu en eau (Paquin, 1985). Un sol sec dégèle plus rapidement qu'un sol humide à cause de la chaleur spécifique élevée de l'eau (Paquin et Méhuys, 1980).

### Les cycles de gel et de dégel

Dans les sols à forte teneur en eau ou mal drainés ainsi que dans les sols lourds, l'alternance de gel et de dégel peut exercer une traction verticale et causer la rupture de la racine principale (Russell *et al.*, 1978). Le déchaussage expose donc le collet et la partie supérieure de la racine aux températures gélives de l'air et à la dessiccation par le vent et le soleil. De plus, la traction exercée sur la racine peut briser les radicelles, lieu important d'absorption de l'eau et des minéraux.

Les cycles de gel et de dégel ont aussi une influence sur le niveau d'endurcissement des plantes puisque ce dernier est étroitement lié à la température de l'air et du sol (Paquin, 1984). Si la température moyenne de l'air s'élève au-dessus de 10°C pendant quelques jours, la tolérance au gel chez la luzerne diminue (Jung et Smith, 1960; Paquin, 1985). Les cultivars moins dormants répondent plus rapidement et perdent leur tolérance au gel plus rapidement que les cultivars dormants (Paquin, 1985). Cependant, la luzerne peut s'endurcir à nouveau avec l'abaissement subséquent de la température pourvu que les réserves nutritives soient suffisantes (Jung et Smith, 1960; Paquin, 1977).

#### **1.1.1.2 Les facteurs biotiques**

La survie à l'hiver dépend aussi de la tolérance ou de la résistance des plantes à des facteurs biotiques. Les plus importants sont : les maladies, les insectes et les mauvaises herbes.

### Les maladies

Les maladies qui s'attaquent à la luzerne sont nombreuses et variées. Cependant, celles qui affectent les racines et les collets telles les pourritures et certains flétrissements réduisent la survie à l'hiver des plantes. En effet chez la luzerne, ces deux organes sont vivaces et ils assurent la reprise de la croissance au printemps et après chaque coupe. De plus, selon des travaux effectués sur deux maladies causées par les *Fusarium*, les processus physiologiques qui sont impliqués dans l'endurcissement sont affectés par la présence des agents pathogènes, ce qui réduit la tolérance au gel des plantes (Richard *et al.*, 1982). Le gel peut également causer des dommages importants aux plantes et rendre ces dernières plus susceptibles aux maladies. L'utilisation de cultivars résistants permet néanmoins de réduire l'impact des maladies.

### Les insectes

Plusieurs insectes s'attaquent à la luzerne dont la mineuse virgule (*Agromyza frontella*), le charançon postiche (*Hypera postica*) et la cicadelle de la pomme de terre (*Empoasca fabae*) (C.P.V.Q., 1989). Il a été démontré que la tolérance au gel chez la luzerne est réduite par l'infestation de nématodes (Suzuki et Willis, 1974) et de pucerons du pois (Harper et Freyman, 1979). Les modes de répression des insectes sont: la rotation des cultures, les coupes hâtives, l'utilisation des cultivars résistants, la lutte biologique et les insecticides.

### Les plantes nuisibles

La compétition entre les mauvaises herbes et la luzerne pour les ressources du milieu (eau, minéraux, lumière) se traduit par une réduction de la densité optimale de l'espèce (Beuselincx *et al.*, 1994). La compétition retarde le développement de la plante et diminue sa capacité à survivre à l'hiver. Les modes de répression des plantes nuisibles dans les cultures de luzerne impliquent des méthodes mécaniques, culturales, physiques et chimiques (C.P.V.Q., 1989). Chacune de ces méthodes peut s'utiliser seule ou combinée lors de la préparation du semis, de l'implantation et durant l'exploitation des plantes fourragères.

### 1.1.2 La gestion

Toutes les pratiques culturales qui favorisent le développement de la plante et l'augmentation des réserves nutritives au niveau des collets et des racines favorisent sa tolérance au gel.

#### Le drainage du sol

La luzerne est très sensible à un mauvais drainage. Elle doit être cultivée sur un sol profond et bien drainé (C.P.V.Q., 1989). Un excès d'eau peut causer l'asphyxie des racines, favoriser le développement de maladies, réduire l'endurcissement, accroître l'acidité du sol, et augmenter la mortalité due au gel et à la formation d'une couche de glace. L'humidité du sol peut donc affecter directement l'endurcissement et la survie à l'hiver de la luzerne. Des recherches ont démontré qu'une humidité inférieure à 50% de la capacité au champ est favorable à l'endurcissement (Paquin et Méhuys, 1980), tandis qu'un pourcentage d'humidité près du point de saturation est considéré comme néfaste pour la luzerne (Paquin et Méhuys, 1980; Suzuki, 1977; Suzuki *et al.*, 1975). De plus, les conditions de sécheresse pendant l'endurcissement aident à accroître la tolérance au gel (Tysdal, 1933) puisqu'un endurcissement partiel peut être obtenu par un stress hydrique à des températures normales de croissance. Les stress hydriques activent l'expression des caractères qui aident à stabiliser la structure membranaire même lorsque la dessiccation des cellules est induite par le froid (Willemot et Pelletier, 1979). Cependant, les dommages causés à la cellule lors d'une dessiccation trop importante empêchent ces caractères de s'exprimer de façon optimale chez l'avoine et l'orge (Cloutier et Siminovitch, 1982). La dessiccation n'est donc pas aussi efficace que l'acclimatation au froid pour induire la tolérance au gel. Des travaux effectués sur la luzerne ont démontré que la sécheresse du sol combinée aux effets des basses températures augmentaient la tolérance au gel de 4 à 5°C chez cette légumineuse (Paquin et Méhuys, 1980). Cela signifie que les déficits hydriques et les basses températures peuvent contribuer de façon additive pour accroître la tolérance au gel (Willemot et Pelletier, 1979; Paquin et Méhuys, 1980).

### Le chaulage

Le chaulage est aussi très important puisque la luzerne ne supporte pas les sols acides. Un pH de 6.5 à 7.5 est optimum pour cette espèce (C.P.V.Q., 1989). Un sous-sol trop acide réduit la pénétration en profondeur des racines, diminue la disponibilité des nutriments essentiels et augmente la disponibilité de l'aluminium et du manganèse qui sont, à forte dose, des éléments toxiques pour les plantes (Elliott *et al.*, 1973).

### La fertilisation

La fertilité et le pH du sol sont des facteurs importants dans la survie à l'hiver des plantes. Les éléments fertilisants les plus essentiels pour la persistance de la luzerne sont le potassium et le phosphore. L'application de potassium (K) favorise l'acclimatation au froid de la luzerne (Twamley, 1960 ; Calder et MacLeod, 1966). Une fertilisation potassique élevée permet d'accroître le niveau des hydrates de carbone qui constituent les réserves nutritives dans les racines de luzerne ce qui contribue à sa survie à l'hiver. Par contre, l'application de phosphore (P) favorise la croissance végétative (Twamley, 1960) et par conséquent une disponibilité trop grande de cet élément à l'automne retarde l'acclimatation des plantes. Un rapport P/K de 0,4 serait optimum pour l'acclimatation au froid de la luzerne (Jung et Smith, 1959). Ce rapport influencerait la synthèse des acides aminés et celle des protéines chez la luzerne (MacLeod et Suzuki, 1967). En général, les carences en éléments minéraux aussi bien qu'une fertilisation trop forte diminuent l'acclimatation et la survie à l'hiver des plantes (Paquin, 1985).

### Le choix du cultivar

Les cultivars de luzerne utilisés en Amérique du Nord sont dérivés de neuf sources distinctes de germoplasmes soient : *M. falcata*, Ladak, *M. varia*, Turkestane, Flamande, Chilienne, Péruvienne, Indienne et Africaine. Elles sont classées ici par ordre décroissant de survie à l'hiver. Ces germoplasmes diffèrent en ce qui a trait à la dormance automnale et au potentiel de tolérance au gel (Barnes *et al.*, 1977).

La dormance automnale est étroitement associée à la survie à l'hiver. Les cultivars qui ont peu de croissance à l'automne à cause de leur dormance ont généralement une meilleure survie que les cultivars non dormants (Dexter *et al.*, 1930 ; Heinrichs *et al.*, 1960; Larson et Smith, 1963; Smith, 1961). Cela est dû au fait que les cultivars dormants de luzerne s'endurcissent plus tôt en automne et plus rapidement que les cultivars non dormants. De plus, lorsque les températures fluctuent (gel/dégel) pendant l'hiver, les cultivars moins dormants se désendurcissent plus rapidement et peuvent même reprendre leur croissance (Buxton, 1989), s'exposant ainsi à des dommages causés par des basses températures subséquentes.

Les cultivars dormants sont caractérisés par un port prostré et un grand nombre de tiges tandis que les cultivars à dormance tardive ont un port plus dressé et une croissance supérieure en automne (Smith, 1961). La sélection pour une meilleure survie à l'hiver basée sur la dormance s'oppose donc à la sélection pour un meilleur rendement, celui-ci étant généralement associé à la vigueur de la repousse et à la hauteur des plantes (Busbice et Wilsie, 1965; Smith, 1961). Toutefois, les résultats de Busbice et de Wilsie (1965) indiquent qu'il serait possible de sélectionner à la fois pour la croissance automnale, la survie à l'hiver et une reprise de la croissance plus rapide après une coupe.

### Le régime d'exploitation

Il existe une relation étroite entre, d'une part, le niveau des réserves nutritives accumulé dans les racines et les collets chez la luzerne à l'automne et, d'autre part, la productivité, la vigueur et le maintien du peuplement l'année suivante (Gervais et Bilodeau, 1985; Gervais et Girard, 1987). L'automne est donc une période critique pour la luzerne. À cette époque, elle doit synthétiser et emmagasiner des réserves dans ses racines, qui permettront l'acclimatation au froid durant l'hiver et assureront le regain au printemps suivant. Sous nos conditions hivernales rigoureuses, il est préférable de ne pas faire de coupe de la fin août au début d'octobre, soit durant une période d'environ six semaines (Gervais et Bilodeau, 1985). De plus, la coupe de fin d'été doit être prise suffisamment tôt pour que la luzerne puisse refaire ses réserves avant les premières gelées mortelles (C.P.V.Q., 1989).

Par conséquent, des coupes fréquentes ou une coupe automnale prise au cours de la période critique (septembre et début octobre) ne permettent pas aux plantes d'accumuler suffisamment de réserves avant les premiers gels, ce qui réduit leur potentiel de survie à l'hiver.

## 1.2 Les dommages causés par le gel

Deux types de gel peuvent survenir dans les cellules végétales : le gel intracellulaire et le gel extracellulaire. La vitesse de refroidissement détermine le site de formation de la glace. La formation de glace intracellulaire se produit lorsque la vitesse de refroidissement est élevée ( $>4^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ ) (Levitt, 1980). L'eau cristallise dans la cellule lorsqu'une nucléation interne survient ou lorsqu'un cristal de glace qui provient du milieu environnant pénètre à l'intérieur de la cellule (Guy, 1990). Dans les deux cas, un tel gel est considéré comme létal puisque les cristaux de glace qui sont à l'intérieur de la cellule prennent rapidement de l'expansion et détruisent mécaniquement la membrane plasmique (Levitt, 1980). De plus, la formation de glace entraîne une augmentation de la force ionique de la solution cellulaire résiduelle, ce qui provoque une désorganisation des structures cellulaires.

Dans la nature, la vitesse de refroidissement est rarement plus élevée que  $1^{\circ}\text{C}$  à l'heure (Steffen *et al.*, 1989), ce qui favorise le gel extracellulaire. Ce type de gel permet à la glace de se retrouver exclusivement à l'extérieur de la cellule (Guy, 1990), ceci dû à la diffusion de l'eau hors de la cellule et à la paroi cellulaire qui agit comme une barrière à la propagation des cristaux de glace vers l'intérieur de la cellule (Levitt, 1980).

Selon Mazur (1969), lors d'un gel, la cellule et le liquide qui l'entoure entrent initialement en surfusion. Mais, rapidement, la glace se forme dans la région extracellulaire. Ce phénomène limite la formation de la glace à l'extérieur de la cellule. Toutefois, lorsque la température continue à baisser, une plus grande proportion de la solution extracellulaire est convertie en glace. Cela entraîne une baisse de la pression de vapeur d'eau à l'extérieur de la cellule créant ainsi un gradient entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Pour rétablir

l'équilibre de pression de vapeur, l'eau présente dans la cellule peut soit geler (gel intracellulaire) ou diffuser hors de la cellule vers l'espace extracellulaire. La formation de glace dans l'espace extracellulaire, quoique moins dommageable pour la plante, cause plusieurs stress secondaires : (1) la déshydratation de la cellule (Guy, 1990), (2) l'augmentation de la concentration ionique du contenu cellulaire qui peut avoir des effets toxiques (Gusta *et al.*, 1975), (3) la fusion des membranes intracellulaires, et (4) des réactions oxydatives délétères (Crowe *et al.*, 1983).

Selon Steponkus *et al.* (1993), la membrane plasmique est le premier site de dommages induits par le gel. Ceci implique que tous les changements biochimiques qui permettent de stabiliser la membrane et les protéines lors de la déshydratation sont susceptibles d'accroître la tolérance au gel de la plante.

### **1.3 La tolérance au gel**

La luzerne est une légumineuse vivace, qui pour survivre à l'hiver, doit acquérir une certaine tolérance au gel. Les conditions climatiques qui prévalent à l'automne induisent l'acclimatation au froid et déterminent le niveau maximum de tolérance au gel qui sera atteint (McKenzie et McLean, 1980). Selon Ouellet (1970, 1977), les facteurs climatiques les plus importants pour induire l'acclimatation au froid sont la photopériode et la température.

Selon Barnes *et al.* (1979), la lumière influence la tolérance au gel des plantes par ses effets sur l'accumulation des réserves et sur la croissance. Une réduction de la photopériode à l'automne est nécessaire à l'acclimatation au froid de certains cultivars de luzerne (Hodgson, 1964). Ce facteur induit une acclimatation partielle menant à un ralentissement de la croissance et à des changements dans le métabolisme. Chez la luzerne, l'action des jours courts serait liée à des changements dans les niveaux de certains régulateurs endogènes de croissance (Waldman *et al.*, 1975). Les jours courts sont donc essentiels pour initier l'endurcissement. Cependant, une fois le phénomène initié, les plantes continuent à

s'endurcir sous l'effet des températures froides indépendamment de la photopériode (Paquin et Pelletier, 1980).

Dans nos régions, l'acclimatation au froid de la luzerne débute lorsque les températures moyennes de l'air atteignent 10°C et s'accélère quand celles-ci se rapprochent de 5°C, ce qui coïncide généralement avec les premières gelées automnales (Paquin et Pelletier, 1980 ; Paquin, 1984). La tolérance au gel continue d'augmenter après la sénescence des tiges et même sous la neige alors que le sol commence à geler (Paquin, 1985). Durant cette période, l'acclimatation dépend principalement de l'abaissement de la température de l'air et du sol. Sous nos conditions climatiques, le maximum de tolérance au gel est atteint entre décembre et mars, selon les années et les sites (Paquin et Pelletier, 1980 ; Paquin, 1984). Une température constante sous zéro est en général plus favorable à l'acclimatation qu'une alternance de température (Chen et Li, 1980). De plus, des températures de -2 à -4°C sont nécessaires à l'obtention et au maintien de l'endurcissement maximal chez la luzerne et le blé d'automne (Gusta et Fowler, 1979 ; Roberts, 1984).

Au printemps, les plantes perdent leur tolérance au gel quand la température du sol s'élève au-dessus de 5°C (Paquin, 1984). Le désendurcissement est complet quand la température moyenne de l'air atteint 15°C (Paquin, 1985). Il faut généralement 3 à 6 semaines à la luzerne pour perdre complètement sa tolérance au gel, ce qui lui permet de supporter les gelées tardives du printemps (Paquin et Pelletier, 1980).

#### **1.4 Les changements biochimiques**

Plusieurs changements biochimiques se produisent lors de l'acclimatation au froid des plantes. On observe alors des modifications dans la composition des lipides, des protéines, des sucres, des acides aminés et dans l'expression génétique (Steponkus, 1984). La présente recherche porte plus spécifiquement sur l'accumulation des sucres cryoprotecteurs et sur l'expression des gènes induits par le froid.

### **1.4.1 Les hydrates de carbones**

Les travaux de Jung et Smith (1961) ont permis de caractériser l'accumulation des hydrates de carbone pendant l'acclimatation au froid de la luzerne et du trèfle rouge. Le pourcentage d'hydrates de carbone totaux non structuraux s'accroît pendant l'automne, atteint un maximum entre décembre et février et diminue progressivement jusqu'au printemps. Toutefois, le niveau des sucres totaux dans les collets n'est pas proportionnel à la tolérance au froid des cultivars de luzerne lors du maximum d'endurcissement (Paquin et Lechasseur, 1982). L'augmentation des réserves de sucres solubles et d'amidon dans les collets et les racines au cours de l'acclimatation est, cependant, considérée comme un facteur déterminant du niveau de tolérance au gel chez la luzerne (Bertrand et Paquin, 1991). Sauter et van Cleeve (1991) ont conclu que, chez le *Populus*, le type d'hydrates de carbone qui s'accumulent dans les organes de réserve est plus important pour la tolérance au froid que le contenu total en sucres.

#### **1.4.1.1 L'amidon**

À l'automne, les hydrates de carbone sont principalement composés d'amidon. Cette proportion diminue au fur et à mesure que l'amidon est hydrolysé en saccharose (Jung et Smith, 1961; Bula et Smith, 1954). Les enzymes responsables de cette dégradation sont des endoamylases (Volenc et al., 1991). Leur activité augmente lors de l'utilisation de l'amidon (endurcissement, reprise de la croissance et après une coupe) dans les racines de la luzerne. Cependant, les niveaux d'amidon ne diffèrent pas entre des cultivars de luzerne de tolérance au gel contrastante (Jung et Larson, 1972).

#### **1.4.1.2 Le saccharose**

L'endurcissement au froid s'accompagne d'une accumulation importante de saccharose au niveau du collet chez la luzerne (Duke et Doehlert, 1981). Le saccharose s'accumule tôt à l'automne à des températures au-dessus du point de congélation et son niveau continue de s'accroître à des températures sous zéro et cela aussi bien sous des conditions

d'acclimatation naturelles que contrôlées (Castonguay *et al.*, 1995). Les recherches effectuées par Duke et Doehlert (1981) ont démontré que les cultivars de luzerne tolérants au froid avaient de plus hauts niveaux de saccharose au début de l'automne que les cultivars non tolérants. Toutefois, lors du maximum d'acclimatation au froid, soit en février, les niveaux de saccharose observés ne diffèrent pas significativement entre des cultivars qui se distinguent dans leurs niveaux d'adaptation au froid (Castonguay *et al.*, 1995).

### La synthèse du saccharose

La synthèse du saccharose se fait grâce à la photosynthèse via les chloroplastes. Le produit final du cycle de Calvin, le 3-phosphoglyceraldéhyde, est transporté du chloroplaste vers le cytoplasme en échange de deux phosphates. Une fois dans le cytoplasme, les trioses-phosphates peuvent servir à la synthèse du saccharose (Devlin et Witham, 1983). Pour ce faire, deux molécules de 3-phosphoglyceraldéhyde sont condensées par aldolisation pour former un fructose 1,6-diphosphate. Dans les feuilles, cette molécule est soit convertie en fructose 6-phosphate ou isomérisée en glucose 6-phosphate qui par la suite forme l'UDP-glucose. La synthèse du saccharose est finalement régulée par l'enzyme saccharose-phosphate synthase (SPS) à partir de l'UDP-glucose et du fructose 6-phosphate. La réaction inverse est catalysée par l'action de l'enzyme saccharose synthase (SS). Cependant, lorsque les plantes sont sous un couvert de neige, la synthèse du saccharose se fait via l'hydrolyse de l'amidon. Ce phénomène est régulé par des endoamylases ( $\beta$ -amylase et  $\alpha$ -amylase). Le produit final de l'hydrolyse est une molécule de glucose 6-phosphate qui est soit isomérisée en fructose 6-phosphate ou convertie en glucose 1-phosphate qui par la suite forme UDP-glucose. La synthèse du saccharose via cette voie métabolique est également régulée par le SPS.

L'activité du SPS augmente lors de l'exposition des plantes aux basses températures (Castonguay et Nadeau, 1998a). De plus, il existe une corrélation très importante entre l'activité de cet enzyme et le niveau de saccharose dans les collets chez la luzerne. Selon cette étude, l'augmentation de l'activité du SPS survient tôt en automne et atteint des

niveaux plus élevés chez des cultivars rustiques que chez des cultivars sensibles au froid. L'activité de l'enzyme SS, pour sa part, est réduite à l'automne lors de l'acclimatation au froid des plantes.

#### Le rôle cryoprotecteur du saccharose

Le saccharose réduirait les dommages causés aux membranes lors de la déshydratation de la cellule (Schwab et Heber, 1984). Ce sucre interagirait avec les groupements hydroxyliques des phospholipides membranaires en remplaçant l'eau dans le maintien de la structure de la membrane (Koster et Leopold, 1988 ; Caffrey *et al.*, 1988; Hoekstra *et al.* 1989). Ce phénomène permettrait de prévenir la séparation de phase des doubles parois lipidiques ainsi que la fusion de la membrane plasmique (Crowe et Crowe, 1992). De plus, ce disaccharide interagirait avec les protéines pour maintenir l'activité des enzymes lors de la déshydratation (Crowe *et al.*, 1990).

#### **1.4.1.3 Les oligosaccharides**

Une relation étroite a été démontrée entre la capacité des cultivars à accumuler certains oligosaccharides de la série du raffinose, plus précisément le stachyose et le raffinose, et la tolérance au gel de la luzerne (Castonguay *et al.*, 1995). Le stachyose et le raffinose sont pratiquement absents des tissus des plantes non acclimatées au froid et ils s'accumulent tard en automne lors de l'exposition des plantes à des températures gélives. Ces oligosaccharides sont aussi impliqués dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, puisque ce phénomène implique aussi la déshydratation complète ou partielle de la cellule. Les travaux de Ooms et de ses collaborateurs (1993), sur les semences d'*Arabidopsis*, ont démontré que le raffinose et le stachyose ne s'accumulent que dans les grains tolérants à la dessiccation. Lors de leurs expériences, ils ont utilisé divers mutants d'*Arabidopsis* qui étaient insensibles à un régulateur de croissance associée à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, l'acide abscissique, ou déficients dans leur capacité à synthétiser ce composé (Koornneef *et al.*, 1989). Ces résultats sont en accord avec les recherches de Blackman et al. (1992), qui ont démontré qu'il existe une relation étroite entre l'accumulation du

stachyose et le développement de la tolérance à la dessiccation chez des graines de soya (*Glycine Max* [L.] Merr., cv Chippewa 64) déshydratées à différentes vitesses. De plus, ces oligosaccharides disparaissent de façon concomitante avec la perte de la tolérance à la dessiccation chez les graines de soya (*Glycine Max* [L.] Merr.), de pois (*Pisum sativum* L.) et de maïs (*Zea mays* L.) (Koster et Leopold, 1988). Ces résultats suggèrent que ces sucres jouent un rôle important dans la tolérance à la dessiccation et qu'ils pourraient jouer un rôle similaire lors de l'acquisition de la tolérance au gel, en protégeant la cellule contre la déshydratation induite par le gel (Castonguay *et al.*, 1995).

### La synthèse des oligosaccharides

Le raffinose et le stachyose sont des galactosides du saccharose. Leur synthèse fait appel à des réactions de transgalactosylation par relais à partir de l'UDP-galactose (Courtois et Percheron, 1971). Le raffinose et le stachyose sont synthétisés selon la séquence suivante (Dey, 1990):

#### RÉACTIONS

#### ENZYMES

UDP-D-galactose + *myo*-inositol → galactinol + UDP (1) Galactinol synthase

Galactinol + saccharose ↔ raffinose + *myo*-inositol (2) Saccharose galactosyl transférase

Galactinol + raffinose ↔ stachyose + *myo*-inositol (3) Raffinose galactosyl transférase

Le galactinol synthase (GS) est l'enzyme qui initie la synthèse des oligosaccharides. Selon des recherches effectuées avec divers génotypes de soya, l'enzyme GS est un régulateur important dans la répartition du carbone entre le saccharose et les oligosaccharides (Saravitz *et al.*, 1987). L'enzyme GS montre une augmentation de son activité lorsque les plantes sont exposées aux basses températures (Castonguay et Nadeau, 1998a). De plus, ces recherches ont démontré qu'il existe une relation importante entre l'activité du GS et le niveau d'oligosaccharides contenu dans les collets chez la luzerne. Tout comme pour l'enzyme SPS, le GS s'accumule plus tôt et atteint des niveaux plus élevés chez les

cultivars tolérants que chez les cultivars sensibles au froid.

#### Le rôle cryoprotecteur des oligosaccharides

La présence d'oligosaccharides de la série du raffinose (raffinose et stachyose) semble requise pour permettre au saccharose de protéger de façon maximale les membranes pendant l'acquisition de la tolérance à la dessiccation chez les grains de maïs (Chen et Buris, 1990), de soya (Blackman *et al.*, 1992), et de colza (Leprince *et al.*, 1990). Ces sucres préviendraient la cristallisation du saccharose (Koster et Leopold, 1988 ; Caffrey *et al.*, 1988) et favoriseraient sa vitrification (augmenter la viscosité d'un liquide pour qu'elle soit similaire à celle d'un solide), ce qui stabiliserait les membranes lors de la déshydratation de la cellule (Blackman *et al.*, 1992 ; Caffrey *et al.*, 1988). De plus, ces oligosaccharides pourraient tenir leur efficacité cryoprotectrice d'interactions structurales complexes avec les groupements hydrophiles des phospholipides membranaires (Hincha, 1990).

#### 1.4.2 L'expression génétique

L'exposition des plantes aux basses températures induit des changements importants au niveau de l'expression génétique (Thomashow, 1990). Les travaux effectués par Krasnuk *et al.* (1978), ont permis d'observer des différences qualitatives et quantitatives au niveau de l'activité de certains enzymes hydrolytiques entre un cultivar tolérant et un cultivar sensible au froid. D'autres recherches effectuées au niveau de la synthèse *in vivo* des protéines ont indiqué que ces différences seraient causées par l'altération de la composition protéique des tissus exposés au froid (Guy et Haskell, 1987; Meza-Basso *et al.*, 1986). Les travaux de Mohapatra *et al.* (1987a,b ; 1988), basés sur le marquage radioactif *in vivo* des polypeptides et la traduction *in vitro* d'ARNm purifiés de plantules de luzerne, ont permis de démontrer que la synthèse de plusieurs protéines est initiée ou accrue pendant l'acclimatation au froid. Cette synthèse de *novo* pourrait être reliée soit à la transcription de nouveaux ARNm ou à la traduction d'ARNm préexistants. La modification de la composition protéique des plantes, lors de l'acclimatation au froid, est donc le résultat des changements qui

surviennent au niveau de l'expression génétique (Mohapatra *et al.*, 1987a,b ; 1988). Mohapatra *et al.* (1989) ont par ailleurs observé une corrélation positive entre le niveau d'expression de trois gènes régulés par les basses températures et le degré de tolérance au froid chez quatre cultivars de luzerne. D'autres travaux réalisés par Castonguay *et al.* (1997b), ont démontré qu'il existe une similarité dans les changements de l'expression génétique induits par le froid chez des cultivars de tolérance au gel contrastante. Par contre, l'accumulation des produits de certains de ces gènes suit de près le développement de la tolérance au gel. Il est donc possible que, même si la tolérance au gel est un caractère complexe contrôlé par un grand nombre de gènes, les différences de tolérance au gel entre des cultivars, qui ont des survies à l'hiver différentes, soient déterminées par l'expression différentielle d'un nombre limité de ces gènes. D'autres recherches impliquant des cultivars de pommes de terre (*Solanum commersonii* Dun. et *S. cardiophyllum* Lindl.) (Palta et Simon, 1993) et de pois d'hiver (*Pisum sativum* subsp. *arvense*) (Liesenfeld *et al.*, 1986) supportent cette hypothèse.

Les polypeptides codés par les gènes régulés par le froid pourraient avoir un rôle important en regard de la détermination du niveau de tolérance aux basses températures puisqu'ils sont pratiquement non détectables dans les plantes non acclimatées.

#### 1.4.2.1 Les gènes régulés par le froid

Les niveaux d'expression de plusieurs gènes sont modifiés lorsque les plantes de luzerne sont exposées aux basses températures (Castonguay *et al.*, 1993 ; 1997a). Plusieurs gènes régulés par le froid chez la luzerne ont été isolés et caractérisés : *cas* 17 (Wolfraim et Dhindsa, 1993), *cas* 18 (Wolfraim *et al.*, 1993), *psm* 2075 (Luo *et al.*, 1991), *psm* 2358 (Mohapatra *et al.*, 1989), *pUM* 90-1, *pUM* 90-2, *pUM* 90-4 (Luo *et al.*, 1992), *msaCIA* (Laberge *et al.*, 1993), *msaCIB* (Monroy *et al.*, 1993), *msaCIC* (Castonguay *et al.*, 1994), *msaCID-G* (Castonguay *et al.*, non publié). Plusieurs de ces gènes ne montrent aucune expression différentielle entre des génotypes possédant des niveaux différents de tolérance au gel. Ce qui n'est pas le cas des gènes *msaCIA* et *msaCIC*. Le niveau d'expression de ces deux gènes varie en fonction des niveaux de tolérance au gel atteint par les plantes.

L'analyse de l'accumulation des produits de transcription des gènes *msaCIA* et *msaCIC* dans les collets montre effectivement une accumulation supérieure de ces produits chez un cultivar de luzerne tolérant au froid (Apica) comparativement à un cultivar sensible (CUF-101) (Castonguay *et al.*, 1993).

Le gène *msaCIA* code pour une protéine riche en glycine (30 à 40%) (Laberge *et al.*, 1993). L'expression de ce gène est induite par une variété de stress incluant les basses températures, la déshydratation, la salinité, les blessures et par un régulateur de croissance : l'acide abscissique. La présence d'une région qui présente des homologies avec des peptides signaux et d'un contenu élevé en glycine dans les polypeptides encodés par le gène *msaCIA* (Laberge *et al.*, 1993) suggèrent une localisation pariétale où il exercerait un rôle structural.

Le gène *msaCIC* code pour un polypeptide modulaire composé d'un peptide signal, d'un domaine riche en proline et d'un domaine hydrophobe (Castonguay *et al.*, 1994). Des recherches effectuées dans des bases de données révèlent que le gène *msaCIC* est homologue à une protéine dont on ignore la fonction et l'analyse de sa structure primaire suggère une association possible avec les membranes.

## 1.5 L'amélioration de la tolérance au gel

Tous les cultivars ont la capacité génétique d'augmenter significativement leur tolérance au gel indépendamment de leur potentiel de survie à l'hiver (Castonguay et Guckert, 1996). Cependant, les cultivars n'atteignent pas tous le même niveau de tolérance, ce qui indique qu'une variabilité génétique existe pour ce caractère (Castonguay et Guckert, 1996). Il est donc possible d'améliorer la tolérance au gel de la luzerne en sélectionnant des génotypes qui ont une tolérance au gel supérieure. Pour ce faire, plusieurs méthodes peuvent être utilisées dont : la sélection au champ basée sur la survie à l'hiver, les tests de congélations ( $TL_{50}$ ), et les méthodes utilisant des marqueurs biochimiques (sucres, gènes).

### **1.5.1 La sélection au champ basée sur la survie à l'hiver**

L'approche traditionnelle pour évaluer la survie à l'hiver chez la luzerne est de soumettre les plantes aux rigueurs de l'hiver dans une situation au champ (McCaslin et Woodward, 1995). Une telle sélection requiert un hiver test assez sévère pour éliminer les plantes sensibles et causer des degrés variables de dommages aux plantes qui possèdent une certaine résistance (Paquin, 1985). Les plantes qui démontrent une meilleure reprise après un hiver test sont sélectionnées puis intercroisées. Un tel hiver ne survient que sporadiquement (une fois tous les dix ans) à l'endroit choisi et les dommages, sur un même cultivar, ne sont pas uniformes (Levitt, 1980). Il est donc nécessaire, pour ce genre d'expérimentation, de soumettre du matériel pendant plusieurs années et à différents sites afin d'évaluer adéquatement sa survie à l'hiver (Paquin, 1985). Cette méthode de sélection permet d'évaluer la survie à l'hiver des plantes comme un tout et ne reflète pas spécifiquement la tolérance au gel (Castonguay, comm. pers.).

### **1.5.2 Les tests de congélation**

En raison du peu de contrôle sur les paramètres environnementaux, la sélection de génotypes pour la tolérance au gel peut difficilement être réalisée en conditions naturelles et doit préférentiellement s'effectuer sous des conditions contrôlées (Smith et Krestschmer Jr., 1989). Les tests de congélation, permettent de mesurer les  $TL_{50}$  soit la température à laquelle 50% de la population est détruite. Ces tests sont effectués dans des congélateurs programmés pour abaisser la température de façon graduelle. Cette méthode permet de mesurer la tolérance au gel chez la luzerne et de sélectionner des génotypes plus tolérants aux basses températures (Peltier et Tysdal, 1932). En utilisant cette méthode, Gasser et Willemot (1974) rapportent que des populations de luzerne, obtenues en intercroisant des génotypes ayant survécu aux plus basses températures, sont plus tolérantes au gel et présentent un meilleur regain comparativement aux populations parentales.

### **1.5.3 Les marqueurs biochimiques**

L'accumulation différentielle des oligosaccharides de la série du raffinose ainsi que l'expression différentielle de gènes régulés par le froid chez des cultivars de luzerne de tolérance au gel différente suggèrent leur implication dans la détermination de la tolérance au gel (Castonguay *et al.*, 1995). Si cette hypothèse s'avère juste, ces facteurs biochimiques pourraient servir de marqueurs et faciliter la sélection des génotypes ayant une tolérance au gel supérieure et de là, possiblement une meilleure survie à l'hiver.

### **1.6 Objectifs**

Cette revue de littérature illustre la complexité de la persistance de la luzerne au Québec. Pour accroître la persistance, il devient nécessaire de sélectionner des génotypes possédant une tolérance accrue au gel. Pour ce faire, les programmes d'amélioration ont besoin de méthodes de sélection permettant l'identification spécifique de ce caractère. Une nouvelle méthode de sélection utilisant des stress successifs de congélation a été mise à l'essai afin d'accroître la tolérance au gel de cette légumineuse fourragère.

Les objectifs visés par cette étude sont de :

- 1) Vérifier l'efficacité d'une méthode de sélection utilisant des stress successifs de congélation pour identifier des génotypes et pour générer des populations possédant une tolérance au froid accrue;
- 2) Évaluer l'effet indirect de la sélection sur l'accumulation des sucres cryoprotecteurs ainsi que sur l'expression de deux gènes régulés par le froid : *msaCIA* et *msaCIC* ;
- 3) Évaluer la survie à l'hiver des populations sélectionnées relativement à la population d'origine (Apica).

## **CHAPITRE II**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **2.1 Méthode de sélection**

Une méthode de sélection basée sur l'application de stress successifs de congélation a été développée au Centre de Recherche et de Développement sur les sols et les grandes cultures d'Agriculture et Agroalimentaire Canada pour identifier des génotypes de luzerne possédant une tolérance au gel supérieure. Pour ce faire, 1500 plantes du cv Apica ont été semées, à raison d'une graine par pot de tourbe (Jiffystrips, 5 cm × 5cm × 8 cm), dans un mélange de terreau stérile. Ce dernier est composé de terre et de tourbe (Pro-mix BX, Premier Peat Moss, Rivière-du-Loup, Canada) dans un ratio de 9 : 3 (v/v). Après le semis, les pots ont été placés en aire de propagation pendant une période de 5 semaines. Les conditions environnementales étaient les suivantes : une photopériode de 16 h avec une température de 21°C le jour et de 17°C la nuit. Une irradiance de 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  était fournie par des fluorescents et des ampoules incandescentes. Les plantes ont été arrosées chaque jour et fertilisées une fois par semaine avec un fertilisant commercial (20-20-20, 1 g L<sup>-1</sup>). Après 5 semaines, les plantes ont été soumises à un premier cycle de sélection, composé d'une période d'acclimatation et de trois stress de congélation. Pour ce faire, ces dernières ont été transférées dans des cabinets de croissance pour initier l'endurcissement sous les conditions environnementales suivantes : une photopériode de 8 h, une température constante de 2°C et une irradiance de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Après 2 semaines d'acclimatation, les plantes ont été transférées dans des congélateurs, à l'obscurité, pour une période additionnelle de 2 semaines à  $-2^{\circ}\text{C}$ , afin de simuler les conditions d'endurcissement naturelles dans un sol gelé. À la fin de la période d'acclimatation, les plantes ont été soumises à un premier stress de congélation qui consistait à abaisser la température de  $2^{\circ}\text{C}$  en 30 minutes, suivi d'une pause de 90 minutes à la température résultante avant de procéder à une autre baisse de température (Paquin et Pelletier, 1980). La température a ainsi été abaissée graduellement jusqu'à ce qu'elle atteigne la température de congélation désirée. Les températures de congélation ont été choisies en fonction du  $TL_{50}$  escompté des plantes soit :  $-10^{\circ}\text{C}$  pour le premier et le deuxième stress et  $-12^{\circ}\text{C}$  pour le troisième. Après chaque stress de congélation, les plantes ont été dégelées dans un cabinet de croissance à  $2^{\circ}\text{C}$  pendant une période de 24 heures. Elles ont été ensuite taillées à 5 cm au-dessus du sol puis mises en repousse dans une aire de propagation, pendant une période de 5 semaines, sous les conditions de croissance décrites précédemment. À la fin de chacun des deux premiers stress de congélation, les plantes mortes et les moins vigoureuses ont été éliminées. Environ 3 semaines après le troisième stress de congélation, les 100 plantes les plus vigoureuses ont été sélectionnées et intercroisées pour générer une population de tolérance au froid (TF) potentiellement supérieure : TF1. Les caractères utilisés lors de la sélection furent la tolérance au gel et la vigueur du regain évaluée par le nombre et la vigueur des repousses au niveau de la couronne. À partir de la population TF1, un deuxième cycle de sélection identique au premier a été réalisé. Les températures de congélation retenues pour ce second cycle ont été  $-12^{\circ}\text{C}$  pour les deux premiers stress et de  $-14^{\circ}\text{C}$  pour le troisième. Les 100 plantes sélectionnées à la fin du deuxième cycle ont été intercroisées pour générer la population TF2.

## **2.2 Caractérisation des populations TF1 et TF2**

Trois expériences ont été réalisées pour caractériser le cv Apica et les populations TF1 et TF2. Une expérience a été réalisée au champ pour évaluer la survie à l'hiver ainsi que la dormance automnale. Une seconde expérience a été réalisée en serre non chauffée pour évaluer la tolérance au gel ( $TL_{50}$ ), la teneur en sucres cryoprotecteurs et le niveau d'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC*. Une troisième expérience a été réalisée entièrement sous des conditions contrôlées (aire de propagation et cabinet de croissance) afin d'évaluer la distribution des

génotypes en regard à leur teneur en sucres cryoprotecteurs et à leur niveau d'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC*.

### **2.2.1 Évaluation au champ**

Pour l'évaluation au champ, le cultivar (Apica), les deux populations (TF1 et TF2) ainsi que cinq autres cultivars qui diffèrent dans leur adaptation à l'hiver (AC Caribou, Oneida VR, Ultra, Saranac et CUF 101) ont été utilisés. Le 4 juillet 1996, ces cultivars et populations ont été semés en serre dans des pots de tourbe (Jiffystrips, 5 cm × 5 cm × 5 cm) à raison d'une plante par pot. Le mélange de terreau utilisé a été le même que lors du semis des plantes destinées à la sélection. Dans les serres, les conditions environnementales, étaient les suivantes : une photopériode de 16 h avec une température le jour de 20°C à 28°C et de 20°C à 25°C la nuit. Les plantes ont été arrosées deux fois par jour et fertilisées une fois par semaine avec un fertilisant commercial (20-20-20, 1 g L<sup>-1</sup>). À l'âge de 2 semaines, les plantes ont été inoculées avec une solution de *Rhizobium meliloti* (souche A-2). Le 12 août 1996, soit 5 semaines après le semis, les plantes ont été transplantées à deux sites : St-David (loam sableux) et Plessisville (loam). À chacun des sites, un essai en blocs complets aléatoires constitué de quatre répétitions a été mis en place. Chaque parcelle était composée d'un rang de 25 plantes espacées de 15 cm. L'écartement entre les rangs était de 90 cm. Aucune intervention n'a été effectuée au cours de l'année d'implantation. Lors de l'été 1997, une coupe de nettoyage suivie d'une application d'herbicide (Gramoxone, 4 L/ha) a été effectuée au site de St-David dans le but de contrôler les mauvaises herbes. Aucune intervention n'a été effectuée au site de Plessisville, car la plantation a été détruite au cours de l'hiver 1996-97.

#### **2.2.1.1 Dormance**

L'évaluation de la dormance automnale des plantes a été effectuée au mois d'octobre 1996. Pour ce faire, la hauteur des plantes a été mesurée selon la méthode de Barnes *et al.*, (1995) et un indice de dormance automnale sur une échelle de 1 à 9 a été utilisé (Schwab *et al.*, 1996).

**Échelle de dormance automnale**

1 : 0-5 cm	6 : 25-30 cm
2 : 5-10 cm	7 : 30-35 cm
3 : 10-15 cm	8 : 35-40 cm
4 : 15-20 cm	9 : > 40 cm
5 : 20-25 cm	

Les cultivars qui ont été utilisés pour fin de comparaison sont classifiés selon un indice de dormance automnale (Certified Alfalfa Seed Council, 1996 ; Michaud, comm. pers.) ce qui nous permettra de valider nos résultats au champ.

Caribou	2
Ultra	3
Oneida VR	3
Apica	4
Saranac	4
CUF 101	8

**2.2.1.2 Survie à l'hiver**

Le dénombrement des plantes a été effectué au mois d'octobre 1996, avant les premières gelées mortelles. L'évaluation de la survie à l'hiver a été réalisée au printemps 1997 lorsque les plantes avaient entre 15 et 20 cm de hauteur. Pour ce faire, le nombre de plantes mortes a été déterminé et un indice de dommage sur une échelle de 1 à 5 a été utilisé (McCaslin et Woodward., 1995).

### Échelle de dommage

1 : Aucun dommage	La plante est symétrique et la repousse est uniforme
2 : Dommages légers	La plante est symétrique mais la repousse n'est pas uniforme
3 : Dommages importants	La repousse varie en hauteur
4 : Dommages sévères	La repousse est très irrégulière
5 : Plantes mortes	

### 2.2.2 Évaluation en serre non chauffée et en aire de propagation

L'évaluation de la tolérance au gel ( $TL_{50}$ ) et les analyses biochimiques ont été effectuées uniquement sur le cv Apica et les populations sélectionnées (TF1 et TF2). Pour ce faire deux séries d'expériences ont été réalisées : une expérience en serre non-chauffée et une expérience sous des conditions contrôlées.

Pour l'expérience en serre non chauffée, des graines du cv Apica et des populations TF1 et TF2 ont été semées dans des pots en plastique de 14 cm de diamètre contenant un terreau stérile. Le taux de semis a été de 20 à 30 graines par pot. Les 235 pots du cv Apica et de chacune des populations ont été distribués selon un plan entièrement aléatoire dans une aire de propagation sous les conditions de croissance décrites précédemment. Après émergence, le nombre de plantes a été réduit à 15 par pot. Cinq semaines après le semis, les pots ont été transférés dans une serre non chauffée à St-David près de Québec. Cette serre recouverte de polyéthylène a été continuellement ventilée pendant le jour pour maintenir la température intérieure similaire à celle de l'extérieur. L'utilisation de la serre a permis aux plantes de s'acclimater aux conditions naturelles de température, d'irradiance et de photopériode qui ont prévalu lors de l'automne 1996 et de l'hiver 1997. La température de l'air à l'intérieur de la serre ainsi que la température du sol dans les pots ont été enregistrées grâce à des enregistreurs de données (« datalogger », Omega, RD-Temp). Lorsque les températures de l'air ont chuté de façon permanente sous zéro, les plantes ont été recouvertes d'une couche de laine minérale pour simuler une couverture de neige. La température moyenne du sol au cours de l'hiver 1996-97 a été de  $-2^{\circ}\text{C}$ . Ces conditions devraient normalement permettre d'optimiser

l'expression du potentiel d'acclimatation au froid des plantes. L'utilisation de la serre non chauffée a également facilité le prélèvement des échantillons pendant la saison hivernale. Au cours de l'hiver 1996-1997, cinq prélèvements comprenant 42 pots du cv Apica et des populations TF1 et TF2 ont été effectués : soit à la mi-octobre, à la mi-novembre, à la mi-décembre, au début de février et à la mi-mars. Lors de chaque prélèvement, la tolérance au gel, le regain après un test de congélation, la survie, le pourcentage de matière sèche, l'accumulation des sucres solubles et de l'amidon et l'expression des gènes régulés par le froid *msaCIA* et *msaCIC* ont été évalués.

Dans une seconde expérience réalisée sous des conditions contrôlées (aires de propagation et cabinet de croissance) des graines du cv Apica et des populations TF1 et TF2 ont été semées dans sept permapots de 45 cavités (5 cm<sup>3</sup> par cavité, PGI Plastik, St-Jean-Port-Joli, Canada) contenant un terreau stérile décrit précédemment. Le taux de semis a été de deux graines par cavité. Après émergence, le semis a été éclairci à une plante par cavité. Chaque permapot contenait 15 plantes du cv Apica et de chaque population ; ces 45 plantes étaient distribuées selon un plan entièrement aléatoire. Les permapots ont été distribués selon un plan en blocs complets aléatoires dans une aire de propagation sous les conditions de croissance décrites précédemment. Cinq semaines après le semis, les permapots ont été transférés dans un cabinet de croissance pour l'endurcissement au froid. Les conditions environnementales ont été les mêmes que lors de la sélection. Après 2 semaines d'acclimatation à 2°C, un premier prélèvement a été réalisé sur la partie foliaire de chaque plante, ceci dans le but d'évaluer le niveau des sucres cryoprotecteurs et l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* chez 100 génotypes du cv Apica et de chacune des populations. Par la suite, les permapots ont été transférés dans l'aire de propagation. Après 5 semaines de repousse, les plantes ont été acclimatées 2 semaines à 2°C dans un cabinet de croissance puis 2 semaines à -2°C dans un congélateur. Les permapots ont alors été transférés dans un cabinet de croissance à 2°C afin de permettre le dégel du sol. Vingt-quatre heures plus tard, un deuxième prélèvement a été réalisé sur les collets des plantes acclimatées. Lors de ce prélèvement le niveau des sucres cryoprotecteurs et l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* ont été également évalués.

### **2.2.2.1 Survie et matière sèche**

Six pots contenant chacun 15 plantes du cv Apica ainsi que de chaque population ont été transférés de la serre non chauffée au cabinet de croissance pour être dégelés à 2°C pendant 24 heures pour éviter un dégel trop rapide. Les plantes ont été taillées et transférées dans une aire de propagation. Après 3 semaines de repousse le pourcentage de survie a été calculé en comptant le nombre de plantes vivantes et le regain suite à une exposition aux conditions hivernales a été mesuré. Pour ce faire, la partie aérienne a été prélevée, séchée au four à 80°C pendant 2 jours et pesée. Le poidssec obtenu est alors divisé par le nombre de plantes vivantes afin d'établir le regain par plant.

Le pourcentage de matière sèche des collets a été déterminé en pesant environ 0,5 g de collets par pot. Ces échantillons ont été séchés à 80°C pendant 2 jours puis pesés à nouveau.

### **2.2.2.2 Tolérance au gel (TL<sub>50</sub>)**

La tolérance au gel des plantes est exprimée par la température létale pour 50% des plantes (TL<sub>50</sub>) et est évaluée par un test de congélation suivi d'une repousse de 3 semaines en aire de propagation. Avant le test, la partie aérienne des plantes a été coupée et les pots ont été distribués au hasard dans les congélateurs programmés en utilisant des abaissements de 2°C sur une période de 30 minutes, suivis de pauses de 90 minutes (Paquin et Pelletier, 1980). Les températures de congélation ont été choisies en fonction du degré d'endurcissement des plantes. Les plantes non endurcies ont été testées de -3 à -9°C et celles endurcies, de -10 à -27°C. À la fin de chaque pause, six pots par cultivar et par population ont été retirés et mis à dégeler pendant 24 heures à 2°C. Les pots ont été ensuite placés en aire de propagation. Après 3 semaines de repousse, le pourcentage de survie et le regain suite au test de congélation ont été mesurés.

### 2.2.2.3 Hydrates de carbone

#### Extraction et purification des sucres

Lors de chaque échantillonnage, quatre pots contenant chacun 15 plantes du cv Apica ainsi que quatre pots de chaque population ont été transférés de la serre non chauffée au cabinet de croissance pour être dégelés à 4°C pendant 24 heures. Par la suite les plantes ont été prélevées et nettoyées à l'eau froide. Pour chaque pot, un échantillon de 0,5g (poids frais) de collets a été pesé et broyé dans l'azote liquide. Les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 20 minutes dans 8 ml d'un mélange méthanol-chloroforme-eau (M:C:E, 12:5:1, v/v) dans le but d'inhiber toute activité enzymatique puis conservés au congélateur à -20°C jusqu'à l'extraction.

Lors de l'extraction, chaque échantillon a été maintenu à 0°C dans un bain de glace fondante et broyé au Polytron (Brinkman, Rexdale, ON, Canada). La tête du Polytron a été nettoyée avec 7 ml de M-C-E, pour un volume total pour chaque échantillon de 15ml. Par la suite, les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 762 g et le surnageant a été récupéré dans un tube vissé. Le culot obtenu après la centrifugation a été lavé deux fois avec du méthanol pour le purifier et mis à sécher pour le dosage de l'amidon selon la méthode de Blakeney et Mutton (1980).

À la fin de l'extraction, 1 ml de chloroforme et 4 ml d'eau ont été ajoutés au surnageant pour la séparation des phases. La phase inférieure (chloroforme) contient les lipides, la chlorophylle et les autres pigments et la phase supérieure (méthanol et eau) contient les acides aminés, les sucres, les acides organiques et autres composés hydrosolubles. Les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 762 g et la phase supérieure a été récupérée. De cette phase, 1 ml a été évaporé *in vacuo* dans un évaporateur rotatif et resolubilisé dans 1 ml d'une solution d'acide éthylène-diaminetetraacétique (AEDT ; Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> ; 50 mg L<sup>-1</sup>) puis conservé au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse.

### Dosage des sucres solubles

Les sucres solubles ont été séparés et quantifiés par chromatographie liquide à haute performance sur un système de CLHP de Waters Millennium (injecteur automatique modèle 717+, pompe modèle 610, réfractomètre différentiel modèle 410). La séparation des sucres a été effectuée sur une colonne Sugar-Pak de Waters, éluée à 85°C en mode isométrique, à un débit de 0,5 ml min<sup>-1</sup>, par une solution Ca<sup>2+</sup>-AEDT (50 mgL<sup>-1</sup>). La confirmation de leur l'identité a été effectuée sur une colonne Carbohydrate (Waters) éluée en mode isocratique à 25°C, par de l'acétonitrile 85% à un débit de 2 ml min<sup>-1</sup>. L'identification des pics et la mesure de l'abondance des sucres a été obtenue par comparaison avec des standards. Les résultats sont exprimés en mg g<sup>-1</sup> de poids sec.

### Dosage de l'amidon

Le culot obtenu lors de l'extraction au M-C-E a été purifié par deux lavages successifs au méthanol, asséché puis réfrigéré jusqu'au dosage. Lors du dosage, les culots ont été resuspendus dans 10 ml d'eau et gélatinés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, 5 ml d'un tampon acétate contenant une solution d'amyloglucosidase (50 unités (1.0 mg de glucose libéré en 3 min à un pH de 4.5 et une température de 55°C), Sigma Chemical Company) ont été ajoutés à chacun des tubes. Ces derniers ont été incubés à 55°C pendant 60 minutes pour permettre à la réaction enzymatique de se produire. La méthode de dosage à l'acide p-hydroxy-benzoïque hydrazide (APHBA) a été utilisée pour doser le glucose qui a été libéré lors de l'hydrolyse (Blakeney et Mutton, 1980). Les résultats obtenus ont été comparés à une courbe standard (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µg de standard) obtenue à partir d'amidon commercial (Sigma, A7255), hydrolysé en même temps que les échantillons. Les résultats sont exprimés en mg g<sup>-1</sup> de poids sec.

#### 2.2.2.4 Expression génétique

##### Extraction et quantification d'ARN

Lors de chaque échantillonnage, quatre pots contenant chacun 15 plantes du cv Apica et de chaque population ont été prélevés de la serre non chauffée, dégelés à 4°C pendant 24 heures dans un cabinet de croissance et 0,5g (poids frais) de collets par pot a été broyé en fine poudre dans l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés au congélateur à -80°C jusqu'à l'extraction selon la méthode de De Vries *et al.* (1988). Lors de l'extraction, chaque échantillon a reçu 2 ml par g de poids frais d'un mélange de 1:1 (v:v) de tampon d'extraction d'ARN (100 mM Tris-NaOH (pH 9.0), 1% (p/v) DSS, 100 mM LiCl, 10 mM AEDT) et de phénol additionné d'hydroxyquinoline équilibré avec du TLE (200 mM Tris-HCl à pH 8.0, 100 mM LiCl, 5mM AEDT) préchauffé à 90°C. Les tubes ont été placés sur une plaque et agités pendant 5 à 10 minutes à la température de la pièce. Par la suite, du chloroforme (qualité CLHP) a été ajouté, 1 ml par g de poids frais, à chaque échantillon puis l'agitation s'est poursuivie pendant 15 minutes à la température de la pièce. Les extraits ont été centrifugés à 2000 g pendant 10 minutes à 25°C. Après la centrifugation, la phase aqueuse a été prélevée et transférée dans un microtube de 1,5 ml auquel a été ajouté 0,5 ml de chloroforme. Après la deuxième extraction, 600 µl de la phase aqueuse a été récupérée et transférée dans un nouveau microtube. L'ARN contenu dans ces échantillons a alors été précipité dans 2 M LiCl à 4°C pendant 16-48 h. Après la précipitation, les microtubes ont été centrifugés à 12,000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été lavés une fois avec du LiCl 2 M et à deux reprises avec de l'éthanol 80% (v/v). Les culots séchés sous vide ont été dissous dans du TE (10 mM Tris-HCl à pH 7.4, 1 mM AEDT) et conservés à -80°C.

L'ARN a été quantifié par spectrophotométrie à 260nm. Le niveau d'expression des gènes *msaCIA* (Laberge *et al.*, 1993) et *msaCIC* (Castonguay *et al.*, 1994) régulés par le froid a été quantifié selon la technique de Northern Blot. Pour ce faire, l'ARN a été chauffé à 68°C pendant 5-10 min puis transféré sur une membrane de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham). Ce transfert a été fait par une infiltration sous vide à l'aide d'un appareil à puits multiples (BioRad). Par la suite, les échantillons ont été immobilisés sur la membrane en traitant cette

dernière aux rayons ultra-violet pendant 4 à 5 minutes. L'ARN a été hybridé à 68°C pendant 12 h dans un mélange de 2X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Trisodium citrate) et de poudre de lait 0,25% (p/v) contenant des sondes d'ADN complémentaire aux gènes *msaCIA* et *msaCIC* marquées au  $^{32}\text{P}$ . La quantification du niveau de transcrits correspondant aux deux gènes a été réalisée par scintillation liquide.

### **2.3 Analyses statistiques**

Les résultats de chaque expérience ont été analysés à l'aide du progiciel SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, 1990). La tolérance au gel, qui est représentée par la température à laquelle 50% des plantes ont péri, a été calculée suivant la procédure des « probits » de SAS (SAS Institute, 1990). Tous les autres critères de caractérisation (survie à l'hiver, dormance, regain, accumulation des hydrates de carbones et expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC*) ont été analysés en utilisant la procédure MLG et le PPDS protégé (comparaisons à posteriori protégé) comme procédure de comparaisons multiples. Le niveau de signification qui a été retenu est de 5% ( $\alpha = 0.05$ ). De plus, lorsque le postulat d'homogénéité de la variance de l'erreur expérimentale n'était pas une transformation logarithmique ( $\text{Log}(x+1)$ ) a été effectuée (Steel et Torrie, 1980). Les résultats des analyses statistiques sont présentés en annexes.

## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

#### **3.1 Conditions climatiques**

Les températures moyennes de l'air (°C), l'accumulation de neige (cm) et les précipitations sous forme de pluie (mm), ont été relevées de façon journalière entre le mois d'octobre 1996 et le mois de mai 1997 (Figure 1). La Direction du milieu atmosphérique du Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec a gracieusement fourni ces données qui ont été relevées aux stations météorologiques de Beauséjour et de Laurierville. Ces dernières sont situées respectivement près des sites expérimentaux de St-David et de Plessisville.

L'hiver 1996-97, précédant la première année d'exploitation, a été très rigoureux au Québec. La période hivernale a débuté par des durées variables de froid intense alternant avec des averses de pluie qui ont laissé le sol à découvert. Les chutes de neige se sont produites tardivement ce qui a permis à la glace d'établir un contact direct avec les plantes. Dans la région de St-David, la première accumulation de neige est survenue vers le 8 décembre. Par la suite, la couverture de neige est demeurée élevée (moyenne de 84 cm) pendant tout l'hiver et même au début du printemps. Dans la région de Plessisville, la première accumulation de neige n'est survenue que vers le 26 décembre et l'épaisseur moyenne de la couche de neige a été relativement faible (23 cm).

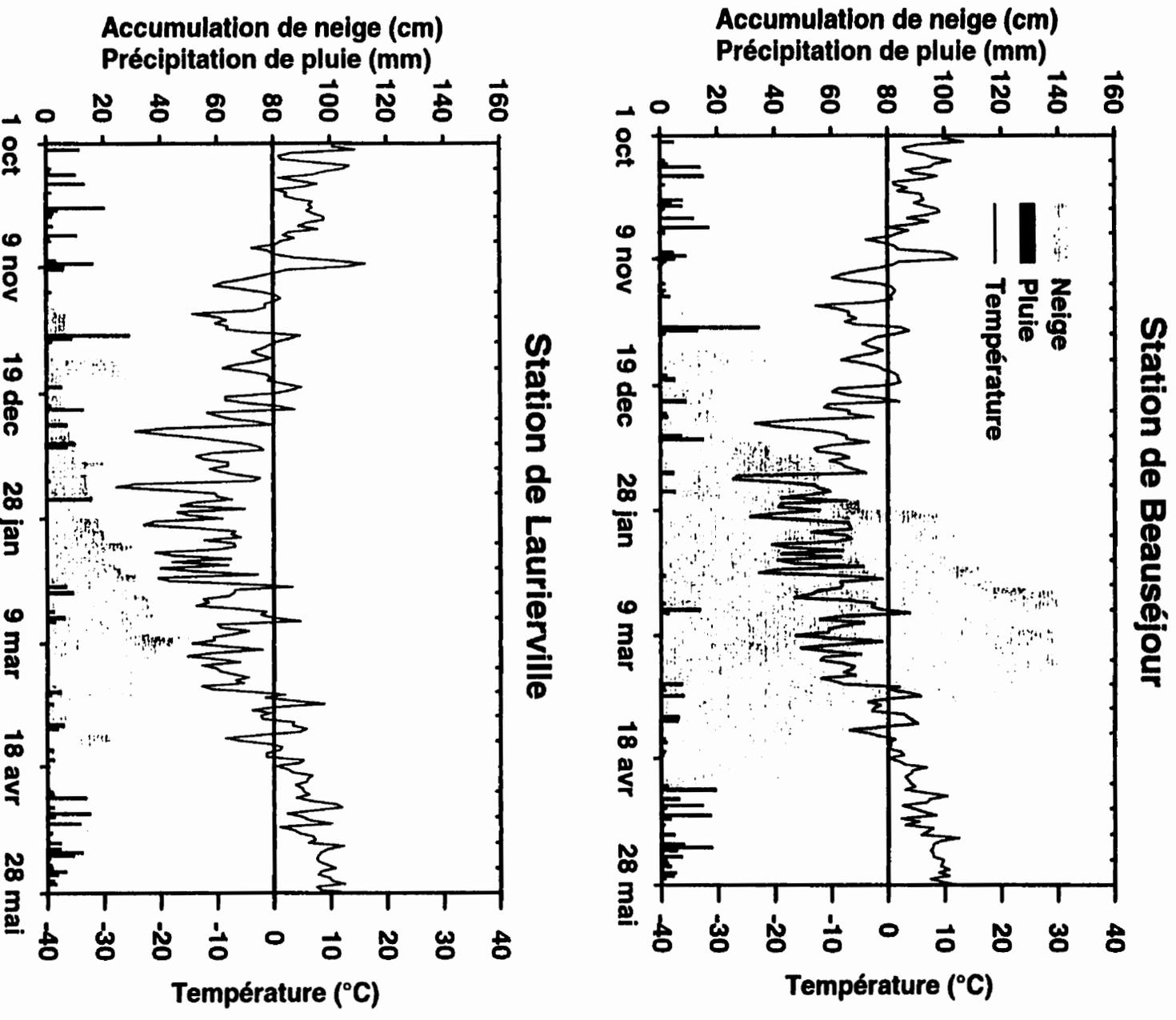


Figure 1. Évolution des températures moyennes de l'air (°C), de l'accumulation de neige (cm) et des précipitations sous formes de pluie (mm) au cours de l'hiver 1996-97 à deux stations météorologiques d'Environnement Québec soit Beauséjour et Laurierville qui sont situées respectivement près des sites de St-David et de Plessisville.

Les températures moyennes de l'air dans ces deux régions ont été sensiblement similaires. La température hivernale moyenne a été de  $-10^{\circ}\text{C}$ . Les précipitations sous forme de pluie et de neige ont été plus importantes dans la région de St-David soit respectivement 400,8 mm et 443,7 cm comparativement à Plessisville où il est tombé 361,5 mm de pluie et 318,5 cm de neige. Les conditions climatiques qui ont prévalu dans la région de Plessisville ont défavorisé la survie à l'hiver des plantes, ceci s'explique par l'effet conjugué des basses températures et de la faible couverture de neige dans cette région. À St-David par contre, la couverture de neige qui fut présente tout au long de l'hiver a su protéger les plantes contre les températures gélives ce qui a favorisé la survie à l'hiver de ces dernières.

## **3.2 Expérience au champ**

### **3.2.1 Dormance**

Une interaction significative « sites  $\times$  cultivars » a été observée pour la dormance automnale. Conséquemment, les résultats sont présentés par site (Tableaux 1 et 2). Aux deux sites expérimentaux, les populations TF1 et TF2 ont présenté une dormance automnale similaire à celle du cv Apica. La sélection n'a donc eu aucun effet significatif sur ce caractère. Le cultivar CUF 101, utilisé comme témoin non dormant, a fourni la croissance la plus importante tandis que AC Caribou, choisi comme témoin dormant, a donné le moins de croissance automnale. Le cv Saranac a, également aux deux sites, présenté la meilleure croissance après CUF 101. L'écart entre AC Caribou et CUF 101 a été de près de 15 cm à St-David alors qu'il a été de moins de 6 cm à Plessisville. À cet endroit, à l'exception des cv CUF 101, Saranac et AC Caribou, les autres cultivars ont présenté des hauteurs qui ne différaient pas de façon significative bien que leur hauteur ait varié différemment entre les deux sites.

Pour la parcelle implantée à St-David, une analyse comparative des indices de dormance automnale obtenue par la mesure de la hauteur des plantes, et des indices publiés par le Certified Alfalfa Seed Council (1996) a révélé une bonne concordance entre les gradations des niveaux de dormance automnale observées et prédites. Cependant, pour les parcelles implantées à Plessisville, l'analyse comparative n'a révélé qu'une faible concordance. Ceci peut être

attribuable 1) aux conditions climatiques relativement chaudes qui ont prévalu en août et en septembre 1996 et qui ont favorisé la croissance des plantes peu importe la dormance du cultivar, 2) au fait d'avoir transplanté les plantes au champ au début du mois d'août ce qui a pu nuire à leur acclimatation et 3) à la gestion de nos parcelles qui fut différente de celle normalement appliquée lors des tests de caractérisation de la dormance chez la luzerne.

La dormance automnale est considérée comme un outil de prédiction de la survie à l'hiver. Les cultivars qui démontrent peu ou pas de dormance automnale sont considérés comme non rustiques et tendent à avoir une plus faible survie à l'hiver (Schwab *et al.*, 1996). Les résultats de St-David semblent indiquer que la sélection sous des stress successifs de congélation n'a pas eu d'effet sur la dormance telle que mesurée par la hauteur des plantes. Cependant, des résultats provenant d'autres années et d'autres sites seront nécessaires pour tirer des conclusions définitives sur cet approche.

### 3.2.2 Survie à l'hiver

Les conditions environnementales qui ont prévalu lors de l'hiver 1996-97, ont causé des dommages importants dans les parcelles de luzerne au site expérimental de Plessisville. On y a noté un taux de mortalité de 90% de la population. À St-David, la mortalité n'a été que de 28%. La différence de mortalité entre les deux sites semble être reliée à la présence et à l'épaisseur de la couche de neige à la surface du sol à St-David. Les populations TF1 et TF2, sélectionnées pour leur tolérance au gel, ont présenté des taux de survie semblables à celui du cultivar d'origine Apica (Tableau 3). À l'exception du cv CUF 101, les cultivars utilisés dans cette expérience ont présenté des pourcentages de survie et des indices de dommages qui ne différaient pas de façon significative. Le cv CUF 101, utilisé comme témoin non dormant a subi des dommages très élevés et a démontré une survie à l'hiver très faible comparativement aux autres cultivars et populations. Les conditions climatiques ont donc été suffisamment rigoureuses pour détruire presque complètement ce cultivar (11% de survie) au site de St-David alors que les autres cultivars ont eu un pourcentage moyen de survie de 80%. Ces derniers sont tous des cultivars présentement recommandés au Québec.

Tableau 1. Dormance automnale de six cultivars et deux populations de luzerne établis à St-David en 1996. Les cultivars et les populations sont classés selon la hauteur moyenne des plantes en cm (HMP) et un indice de dormance automnale (IDA)

Populations	HMP	IDA
AC Caribou	12,8 a	3
TF2	16,1 ab	4
Ultra	16,8 abc	4
TF1	18,4 bc	4
Apica	19,3 bc	4
Oneida VR	19,8 bc	4
Saranac	20,8 c	5
CUF 101	27,4 d	6

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P=0,05$  selon le test du PPDS.

Tableau 2. Dormance automnale de six cultivars et deux populations de luzerne établis à Plessisville en 1996. Les cultivars et les populations sont classés selon la hauteur moyenne des plantes en cm (HMP) et un indice de dormance automnale (IDA)

Populations	HMP	IDA
AC Caribou	12,3 a	3
Apica	12,6 ab	3
TF1	14,6 ab	3
TF2	14,8 abc	3
Oneida VR	15,0 abc	4
Ultra	15,3 abc	4
Saranac	15,8 bc	4
CUF 101	18,1 c	4

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P=0,05$  selon le test du PPDS.

**Tableau 3.** Survie à l'hiver de six cultivars et deux populations de luzerne établis à St-David en 1996-97. Les cultivars et les populations sont classés selon le pourcentage moyen de survie à l'hiver (PMSH) et un indice de dommages (ID)

<b>Populations</b>	<b>PMSH</b>	<b>ID</b>
AC Caribou	82.8 a	3.4 a
Ultra	81.8 a	3.7 a
Saranac	81.5 a	3.7 a
Oneida VR	78.8 a	3.5 a
TF1	78.5 a	3.4 a
Apica	77.0 a	3.7 a
TF2	74.3 a	3.6 a
CUF 101	11.3 b	4.9 b

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P=0,05$  selon le test du PPDS.

L'évaluation des dommages causés aux plantes après un hiver « test » est la méthode traditionnelle pour déterminer la survie à l'hiver de la luzerne. Cependant, l'interaction complexe qui existe entre les plantes et les facteurs environnementaux influence les dommages causés aux plantes lors d'une analyse au champ, ce qui rend difficile l'évaluation de la survie à l'hiver (Schwab *et al.*, 1996). Pour évaluer adéquatement la survie à l'hiver, il est nécessaire de soumettre du matériel pendant plusieurs années à différents sites (Paquin, 1985). Nos résultats d'expérience ne couvrent qu'une année et un site. D'autres travaux permettront de mieux évaluer la survie à l'hiver des populations sélectionnées pour leur tolérance au gel.

### **3.3 Expérience en serre non chauffée**

Afin de caractériser la tolérance au gel des plantes au cours de l'hiver et de suivre l'évolution de certains changements biochimiques étroitement associés au processus d'acclimatation au froid, le cv Apica ainsi que les populations TF1 et TF2 ont été acclimatés dans une serre non chauffée, sous des conditions naturelles de température, d'irradiance et de photopériode lors de l'hiver 1996-97. La tolérance au gel mesurée par le TL<sub>50</sub>, la survie et le regain des plantes exposées aux conditions hivernales, le regain après un test de congélation, l'accumulation des sucres cryoprotecteurs ainsi que l'expression des gènes régulés par le froid ont été évalués à cinq reprises au cours de la saison hivernale.

#### **3.3.1 Survie**

Les pourcentages de survie après une période d'acclimatation en serre non chauffée ne diffèrent pas de façon significative entre Apica, TF1 et TF2 à aucune des dates d'échantillonnage (Figure 2). Entre 95 et 100% des plantes ont survécu à une exposition plus ou moins prolongée aux conditions climatiques de l'hiver 1996-97. Le regain a été supérieur au mois de novembre comparativement aux trois autres dates d'échantillonnage réalisées par la suite. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre Apica, TF1 et TF2 (Figure 3).

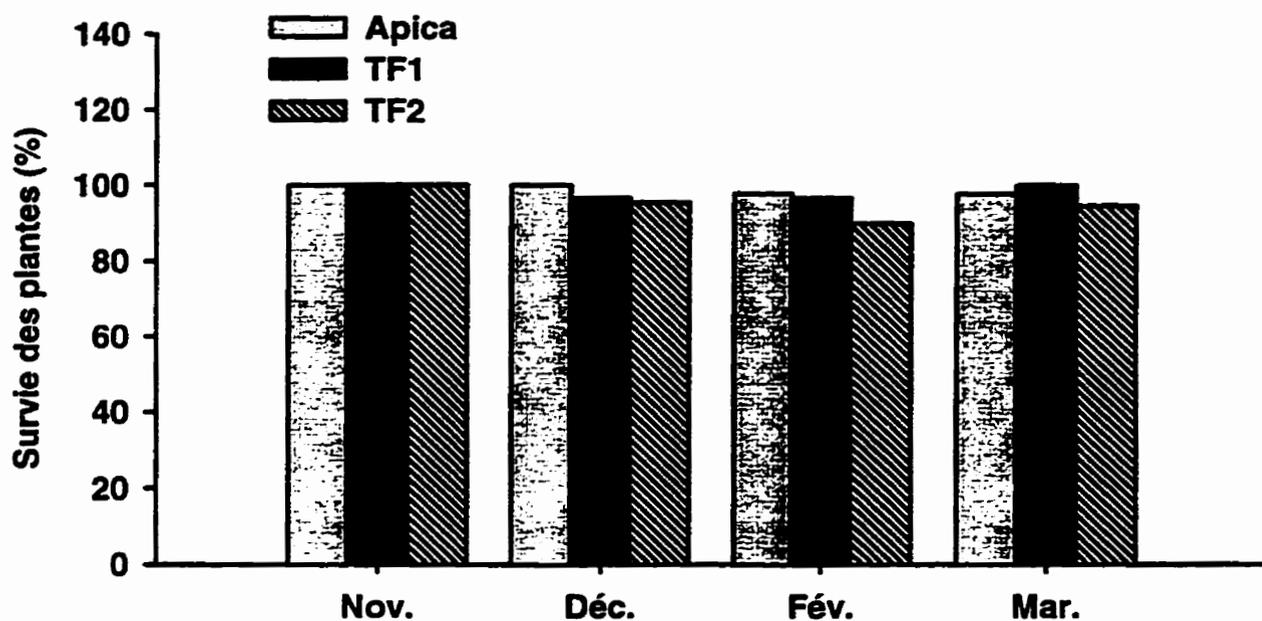


Figure 2. Pourcentage de survie de 90 plantes du cv Apica et de chacune des populations TF1 et TF2 lors de cinq dates d'échantillonnage.

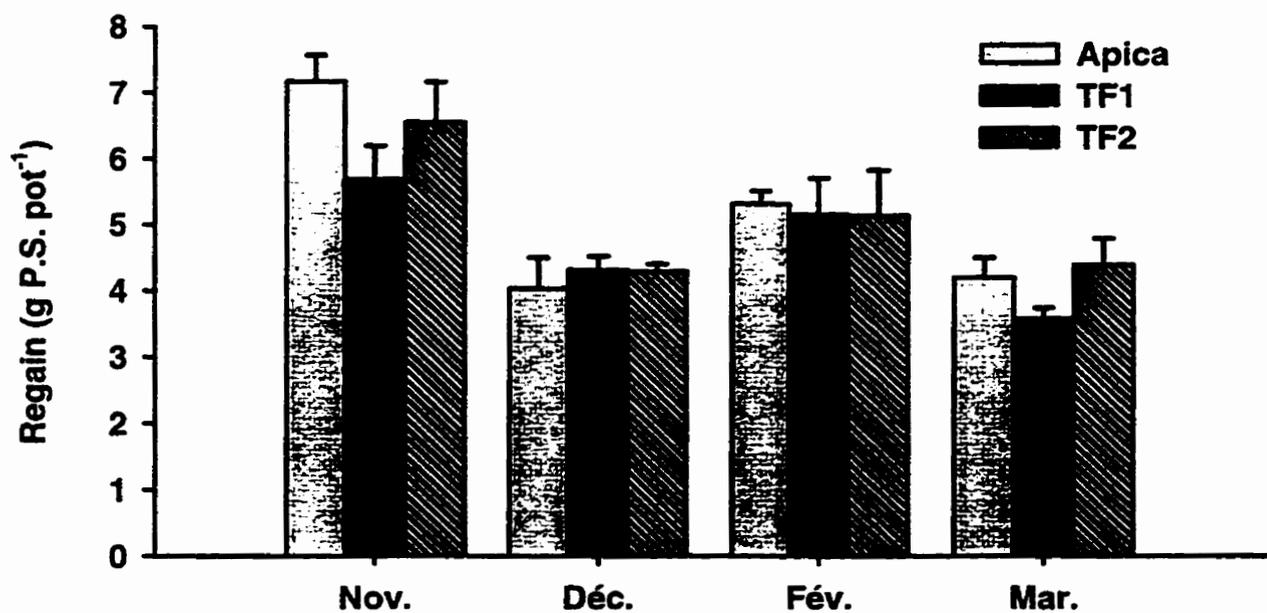


Figure 3. Regain en g de poids sec (P.S.) par pot déterminé après 3 semaines de repousse pour les plantes acclimatées en serre non chauffée. Les erreur-types sont indiquées (n=6).

### 3.3.2 Tolérance au gel ( $TL_{50}$ )

Les deux populations ont démontré une réponse similaire à la population d'origine en ce qui a trait à l'endurcissement au froid (Figure 4). Au mois d'octobre, les plantes n'étaient pas acclimatées au froid, elles possédaient une faible tolérance au gel ( $TL_{50}$  approximatif de  $-5^{\circ}\text{C}$ ) et aucune différence significative n'a été observée entre Apica, TF1 et TF2. Quatre semaines après le transfert dans la serre non chauffée, la tolérance au gel a significativement augmenté et des  $TL_{50}$  de  $-16.9$ ,  $-17.4$  et  $-19.1^{\circ}\text{C}$  ont été observés pour Apica, TF1 et TF2 respectivement. Ces niveaux de tolérance au gel se sont maintenus tout au long de l'hiver jusqu'en mars 1997. Lors des échantillonnages effectués aux mois de novembre et de décembre 1996, la population TF2 possédait une tolérance au gel significativement supérieure à celle d'Apica et de TF1. Aux mois de février et de mars, aucune différence significative n'a été observée entre les populations.

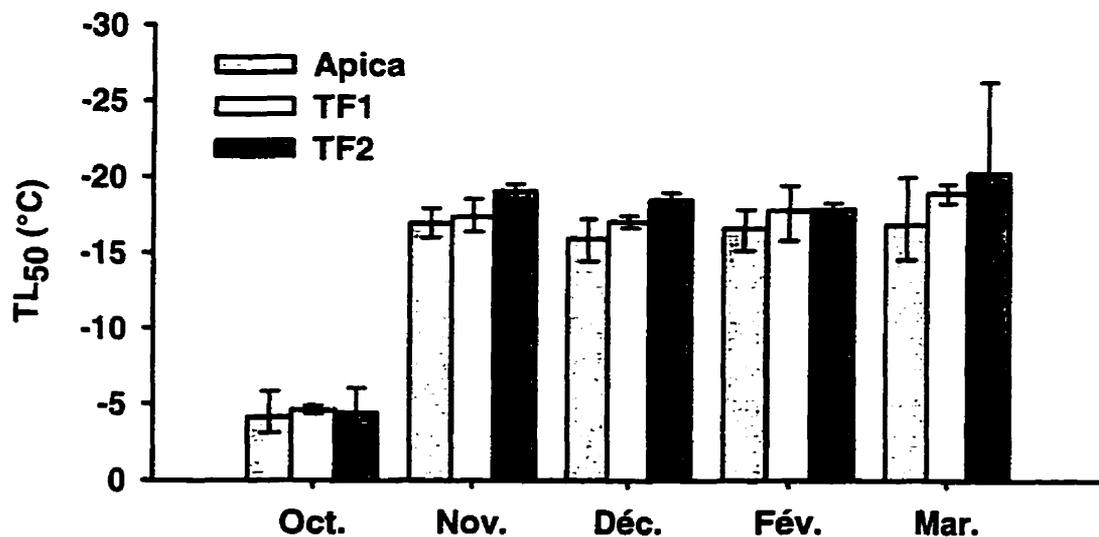


Figure 4. Tolérance au gel du cv Apica et des populations sélectionnées TF1 et TF2. La tolérance au gel est exprimée par le  $TL_{50}$  soit la température à laquelle 50% de la population est détruite. Les intervalles de confiance ont une probabilité de 95%.

Les tests de congélation sont reconnus depuis longtemps comme un moyen efficace pour estimer la tolérance au gel chez la luzerne et pour identifier les populations plus résistantes aux basses températures (Peltier et Tysdal, 1932). Les résultats obtenus montrent que l'abaissement rapide des températures de l'air à l'automne a induit une augmentation importante de la tolérance au gel chez Apica, TF1 et TF2. De plus, les niveaux de tolérance au gel sont demeurés élevés (de  $-16$  à  $-20^{\circ}\text{C}$ ) tout au long de l'hiver. Les conditions environnementales qui prévalent dans une serre non chauffée permettent donc aux plantes d'atteindre des niveaux de tolérance au gel comparables à ceux atteints par des plantes acclimatées au champ (Castonguay *et al.*, 1995).

Dès le mois de novembre, une gradation du niveau de tolérance au gel a pu être observée entre Apica, TF1 et TF2. Ainsi, lors des échantillonnages de novembre et de décembre Apica, la population d'origine, a présenté une tolérance au gel significativement inférieure à celle de TF2, alors que, la population TF1 a maintenu une tolérance au gel intermédiaire. Cette gradation s'est maintenue tout au long de l'hiver. L'augmentation de la tolérance au gel semble donc fortement reliée au nombre de cycles de sélection, puisque celle-ci s'est accrue à chaque cycle. Ces résultats indiquent que l'utilisation de stress successifs de congélation peut se révéler une méthode avantageuse pour sélectionner des génotypes de luzerne plus tolérants au gel.

Un autre moyen d'évaluer la tolérance au gel a été de mesurer l'importance des dommages causés aux plantes suite à une exposition à des températures gélives. Pour ce faire, les plantes ont été remises en condition de croissance pour une période de 3 semaines suite à une période d'acclimatation et à un test de congélation. Les populations sélectionnées pour leur tolérance au gel possédaient un regain supérieur à celui du cultivar d'origine (Figure 5). Lors des cinq dates d'échantillonnage, une gradation dans le regain a pu être observée, avec Apica, ayant le plus faible et TF2 le meilleur regain. Tout comme pour la tolérance au gel, le potentiel de regain des populations sélectionnées semble relié au nombre de cycles de sélection.

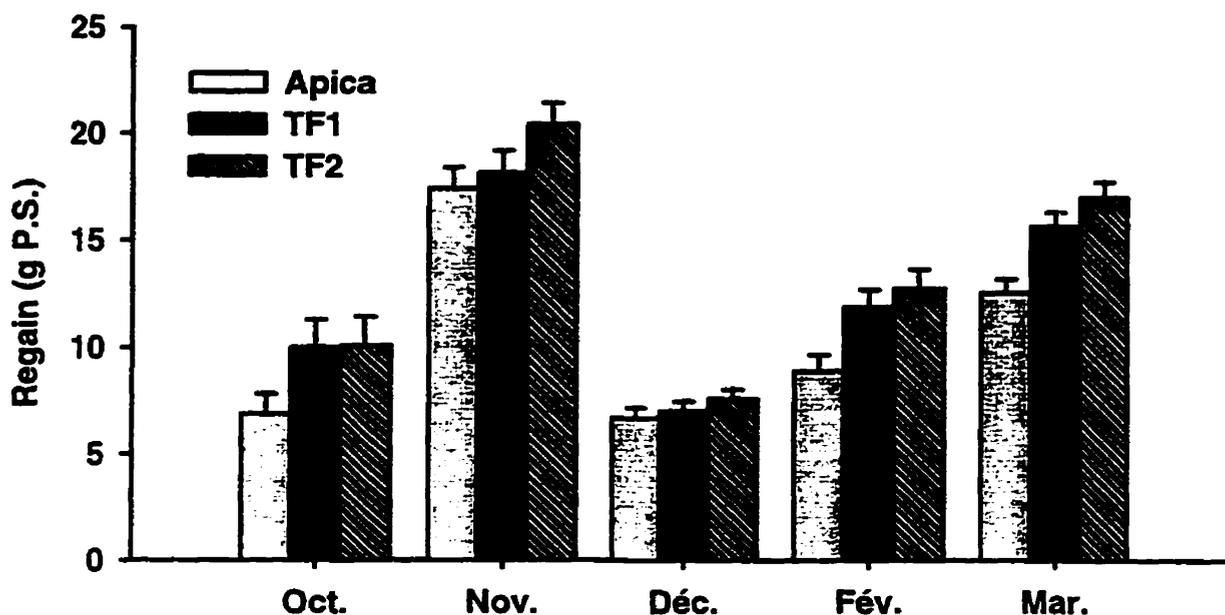


Figure 5. Regain après 3 semaines de repousse pour les plantes endurecies en serre non chauffée et qui ont subi un test de congélation (hiver 1996-97). Données combinées pour l'ensemble des températures à chacun des tests de congélation.

L'analyse des résultats de chacun des échantillonnages montre une baisse du regain en parallèle avec la diminution des températures de congélation (Figure 6). Les différences entre les populations ont été significatives seulement à certaines dates et pour certaines températures de congélation. Cependant, de façon générale, les résultats indiquent une forte tendance pour un regain supérieur de TF1 et surtout de TF2 par rapport à celui du cv Apica. Cette tendance est très marquée pour les échantillonnages réalisés en octobre, en février et en mars. De meilleurs regains observés chez TF1 et TF2 indiquent que les dommages causés par le gel sont moindres chez ces populations que chez la population d'origine Apica. La sélection sous des stress successifs de congélation permet donc de générer des populations qui sont plus résistantes aux basses températures.

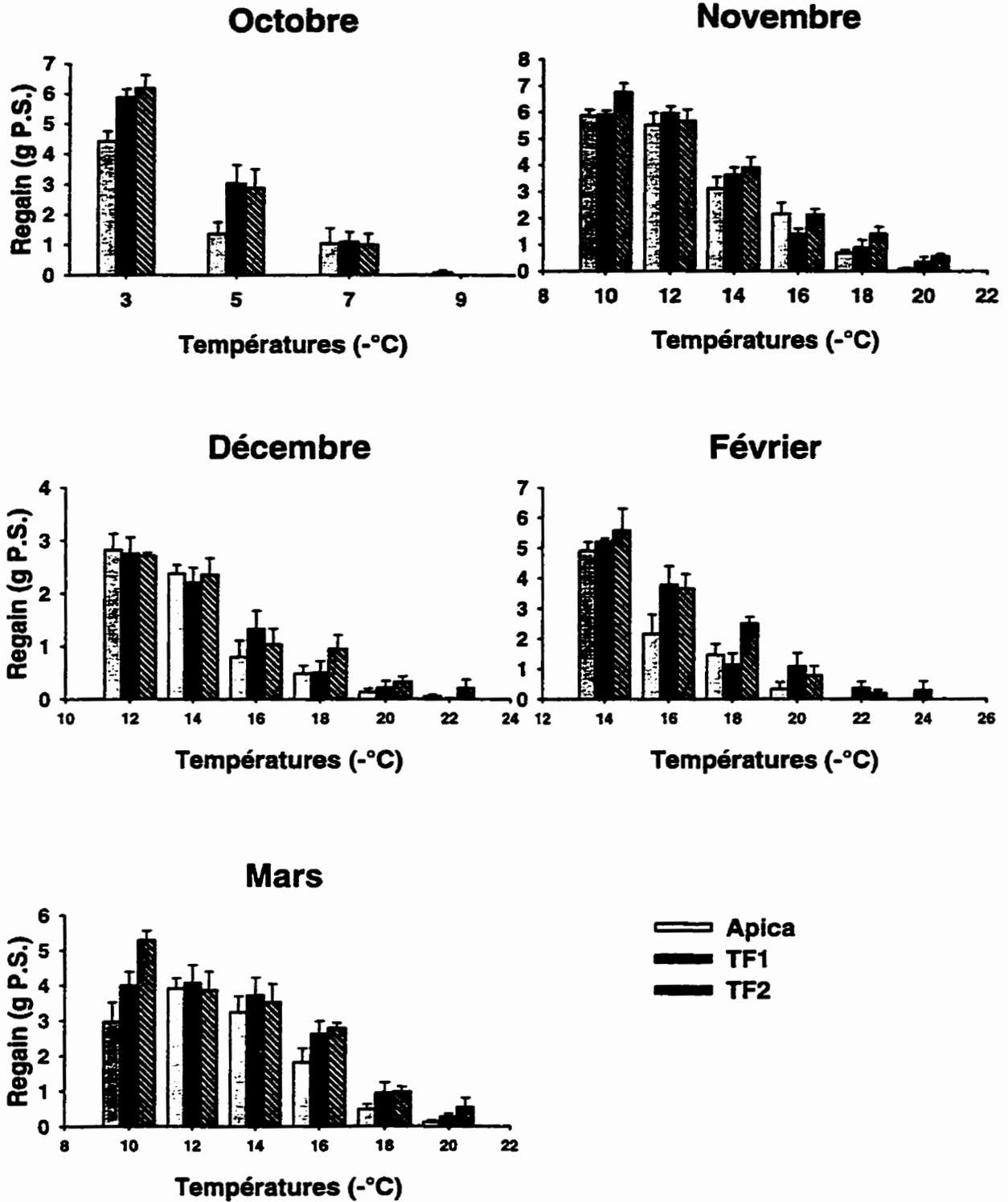


Figure 6. Regain par échantillonnage après 3 semaines de repousse pour les plantes endureties en serre non chauffée et qui ont subi un test de congélation (hiver 1996-97). Les erreurs-types sont indiquées.

### **3.3.3 Hydrates de carbonnes**

#### **3.3.3.1 Amidon**

Les basses températures ont induit une baisse des réserves d'amidon, cependant, aucune différence significative n'a été observée entre la concentration de ce sucre dans les collets chez Apica, TF1 et TF2 et cela pour l'ensemble des dates d'échantillonnage (Figure 7). Selon McKenzie *et al.* (1988), il est peu probable que l'amidon ait un effet direct sur la tolérance au gel chez la luzerne puisqu'aucune corrélation entre les niveaux d'amidon et la tolérance au gel n'a été observée. Nos résultats n'appuient qu'en partie cette hypothèse puisqu'aux échantillonnages de février et de mars, une gradation similaire entre les concentrations d'amidon et la tolérance au gel a été observée entre Apica, TF1 et TF2. Nous avons également noté que la baisse du niveau d'amidon lors de l'exposition aux basses températures coïncidait avec une augmentation des niveaux de saccharose, de stachyose et de raffinose qui sont tous des sucres cryoprotecteurs.

#### **3.3.3.2 Saccharose**

L'acclimatation au froid des plantes a induit une accumulation importante de saccharose dans les collets (Figure 7). Les niveaux de ce sucre sont passés de 40 mg g<sup>-1</sup> PS au mois d'octobre à près de 150 mg g<sup>-1</sup> P.S. un mois plus tard puis les concentrations se sont maintenues tout au long de l'hiver 1996-97. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative entre Apica et TF1 et entre TF1 et TF2. Cependant, des concentrations significativement différentes ont été observées entre Apica et TF2 aux mois d'octobre, de novembre et de février. Au mois d'octobre, soit avant l'acclimatation des plantes, la quantité de saccharose a été supérieure chez le cv Apica comparativement à TF2 tandis que l'inverse fut observé au mois de novembre. Des recherches effectuées sur l'accumulation du saccharose ont démontré qu'il s'accumulait plus rapidement et atteignait des concentrations plus élevées chez les cultivars de luzerne rustiques comparativement aux cultivars non rustiques et cela plus particulièrement à l'automne lors de la phase initiale d'endurcissement des plantes (Castonguay *et al.*, 1995 ; Duke et Doehlert 1981). D'autres recherches ont démontré une augmentation des concentrations de saccharose dans les collets chez la luzerne acclimatée aux basses températures (McKenzie *et al.* 1988).

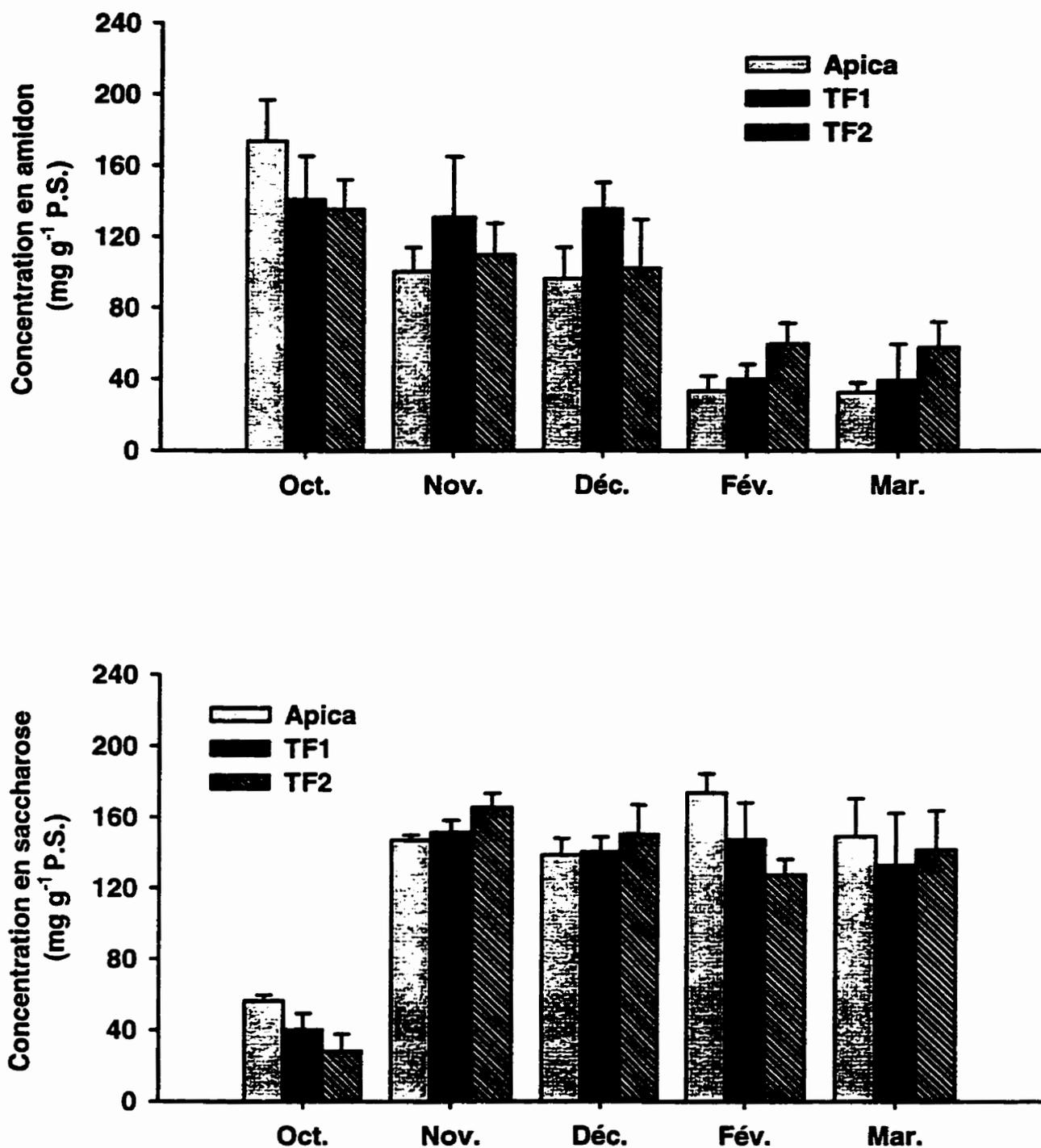


Figure 7. Évolution des niveaux a) d'amidon et b) de saccharose dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4).

Ces travaux pourraient peut-être expliquer la similarité observée entre la gradation des concentrations de saccharose et celle de la tolérance au gel aux mois de novembre et de décembre. Par contre, au mois de février, les quantités de saccharose ont été plus élevées chez le cv Apica comparativement à celle de TF2. Or cette gradation est à l'inverse de celle obtenue pour la tolérance au gel. Ces résultats peuvent être expliqués de trois façons : 1) la relation qui existe entre le saccharose et la tolérance au gel est très complexe, 2) il n'y a pas ou il y a une très faible relation existant entre le saccharose et la tolérance au gel ; une hypothèse en accord avec les résultats obtenus par Castonguay *et al.*, (1995), 3) le saccharose est utilisé en partie pour la synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose ce qui expliquerait la gradation inverse qui a été observée entre le saccharose et les oligosaccharides au mois de février.

### 3.3.3.3 Oligosaccharides de la famille du raffinose

Contrairement au saccharose, qui s'accumule tôt à l'automne, ces oligosaccharides n'ont été détectés, dans les collets des plantes, que lorsque la température du sol s'est maintenue sous le point de congélation, soit au mois de novembre sous nos conditions (Figure 8). Les niveaux de stachyose et de raffinose ont augmenté progressivement pour atteindre un maximum au mois de février puis diminué légèrement par la suite. Les résultats obtenus montrent une concentration significativement supérieure de stachyose en février et en mars ( $\alpha=0,1\%$ ) chez TF2 comparativement à Apica. Nous avons également observé des niveaux de raffinose significativement supérieurs au mois de décembre chez Apica et au mois de février chez TF2. Aucune autre différence significative n'a été observée dans les niveaux de stachyose et de raffinose.

Selon Castonguay *et al.* (1995) une étroite relation existe entre l'accumulation de ces sucres solubles et l'évolution de la tolérance au gel. Ces oligosaccharides seraient à même de protéger les cellules contre la déshydratation induite par le gel. Cependant, lors de l'hiver 1996-97, la tolérance au gel, mesurée par le  $TL_{50}$ , a atteint un niveau élevé dès le mois de novembre et est demeurée élevée jusqu'au mois de mars. Une analyse comparative de l'augmentation de la tolérance au gel et de l'évolution des oligosaccharides révèle une faible coïncidence temporelle entre les deux phénomènes. Ces résultats peuvent être attribuables au fait que les hydrates de

carbone ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans la tolérance au gel. Cette possibilité est est supportée par les résultats de plusieurs recherches effectuées sur la dessiccation puisque ce phénomène cause à la cellule un stress hydrique comparable à celui causé par une déshydratation induite par le gel. Selon Blackman *et al.* (1992), au cours de la dessiccation, les protéines de maturation pourraient jouer un rôle important lors de l'initiation de la réponse de la plante et cela avant même que les oligosaccharides n'aient atteint une concentration élevée. Selon les mêmes auteurs, ces protéines pourraient fonctionner de concert avec les oligosaccharides pour participer au développement de la tolérance à la dessiccation. Selon Lin et Huang (1994), le ratio oligosaccharides / disaccharides (stachyose + raffinose / saccharose) jouerait un rôle déterminant en regard à la tolérance à la dessiccation. Un ratio molaire de 0,05 semble être nécessaire pour développer un certain niveau de tolérance à la dessiccation chez les graines d'espèces arbustives. Selon d'autres travaux effectués par Ooms *et al.*, (1993), sur des semences d'*Arabidopsis thaliana*, le ratio monosaccharides sur oligosaccharides (glucose + fructose / stachyose + raffinose) contrôlerait la stabilité de la tolérance à la dessiccation. Un faible ratio mono / oligosaccharides permettrait la formation ou le maintien d'un état vitrifié stable (Koster, 1991) essentiel pour l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Bruni et Leopold, 1991). Les oligosaccharides pourraient donc jouer un rôle homologue lors de l'acquisition de la tolérance à la déshydratation induite par le gel.

Au mois de février, le stachyose et le raffinose se retrouvent en concentrations significativement plus élevées chez TF2 que chez Apica. La sélection sous des stress successifs de congélation indique donc une relation indirecte et positive entre la tolérance au gel des plantes et les niveaux de raffinose et de stachyose à cette période de l'année. Ces oligosaccharides pourraient donc servir de marqueurs et faciliter la sélection des génotypes ayant une tolérance supérieure au gel, c'est une hypothèse qui mérite d'être étudiée. Cependant, il faut souligner que la période d'acclimatation semble très importante puisque ce n'est que sous un durcissement maximum que l'on observe une concentration différentielle de ces sucres.

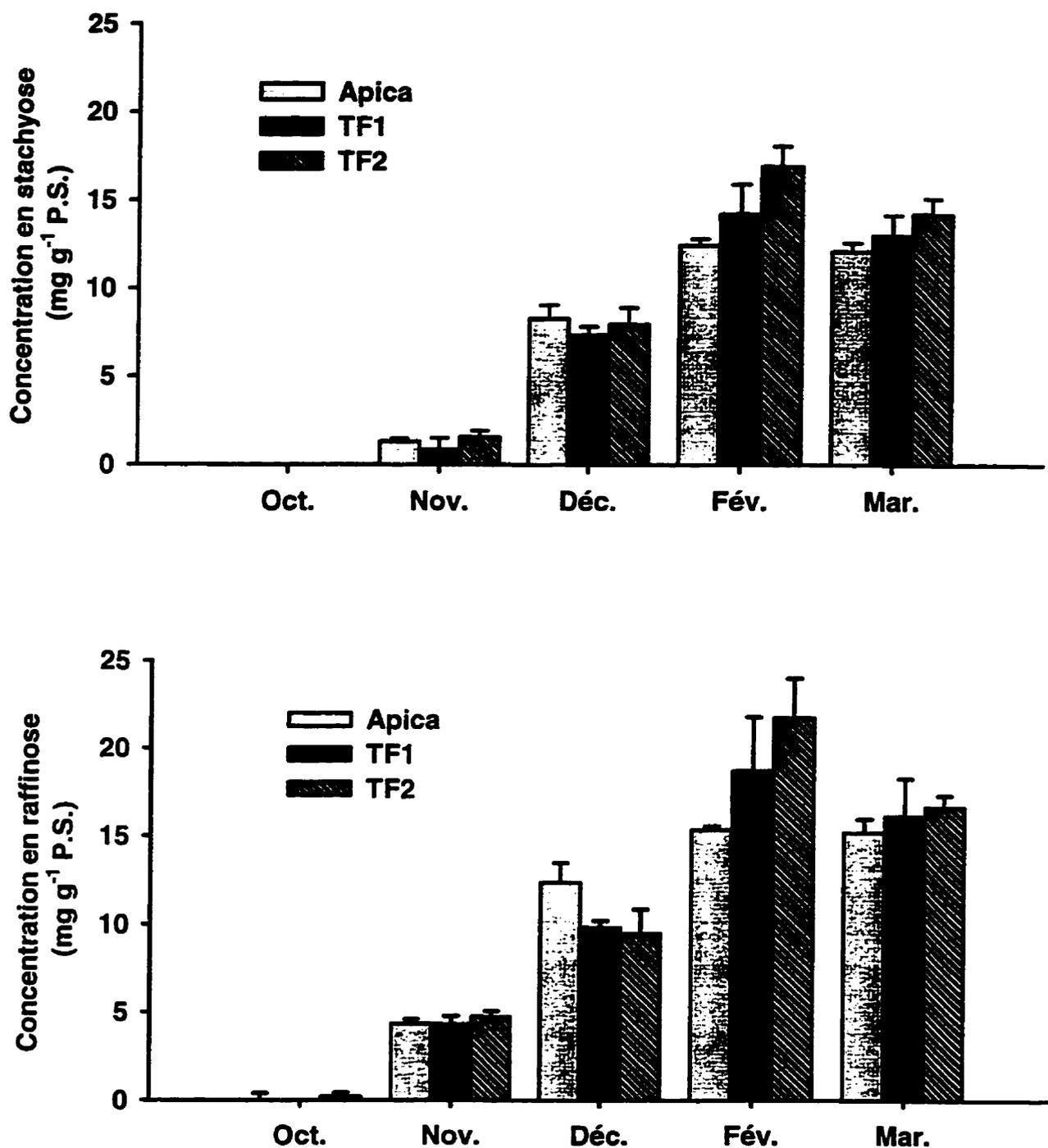


Figure 8. Évolution des niveaux a) de stachyose et b) de raffinose dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4).

### 3.3.3.4 Glucose

Les niveaux de glucose dans les collets sont passés de 4 mg g<sup>-1</sup> PS au mois d'octobre à plus de 10 mg g<sup>-1</sup> PS un mois plus tard (Figure 9). Ces niveaux se sont maintenus pendant tout l'hiver 1996-97. Au mois d'octobre, la quantité de glucose dans les collets du cv Apica était significativement supérieure à celle de TF2. Cependant, l'augmentation du contenu en glucose entre octobre et novembre a été beaucoup plus marquée chez cette dernière. Aucune autre différence significative n'a été observée entre les populations au cours de l'hiver.

L'exposition aux basses températures (serre non chauffée) a induit une accumulation de glucose au niveau des collets en novembre puis un maintien des concentrations par la suite. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Castonguay *et al.* (1995) qui ont observé une baisse graduelle des niveaux de glucose après le transfert des plantes aux basses températures. Selon Koster et Leopold (1988), ce sucre pourrait être négativement relié à la tolérance à la dessiccation induite par le gel en raison de sa participation potentielle dans la réaction de Maillard, qui peut conduire à l'inactivation des protéines et à des modifications au niveau de l'ADN.

### 3.3.3.5 Fructose

Les niveaux de fructose ont augmenté passant d'un peu plus de 0 à près de 3 mg g<sup>-1</sup> PS, entre le mois d'octobre et de novembre (Fig. 9). Ces niveaux ont diminué graduellement pendant l'hiver et aucune différence significative n'a été observée entre Apica, TF1 et TF2 lors des cinq échantillonnages. L'analyse comparative n'a révélé aucune relation entre l'accumulation de ce sucre et l'acquisition de la tolérance au gel. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Castonguay *et al.* (1995).

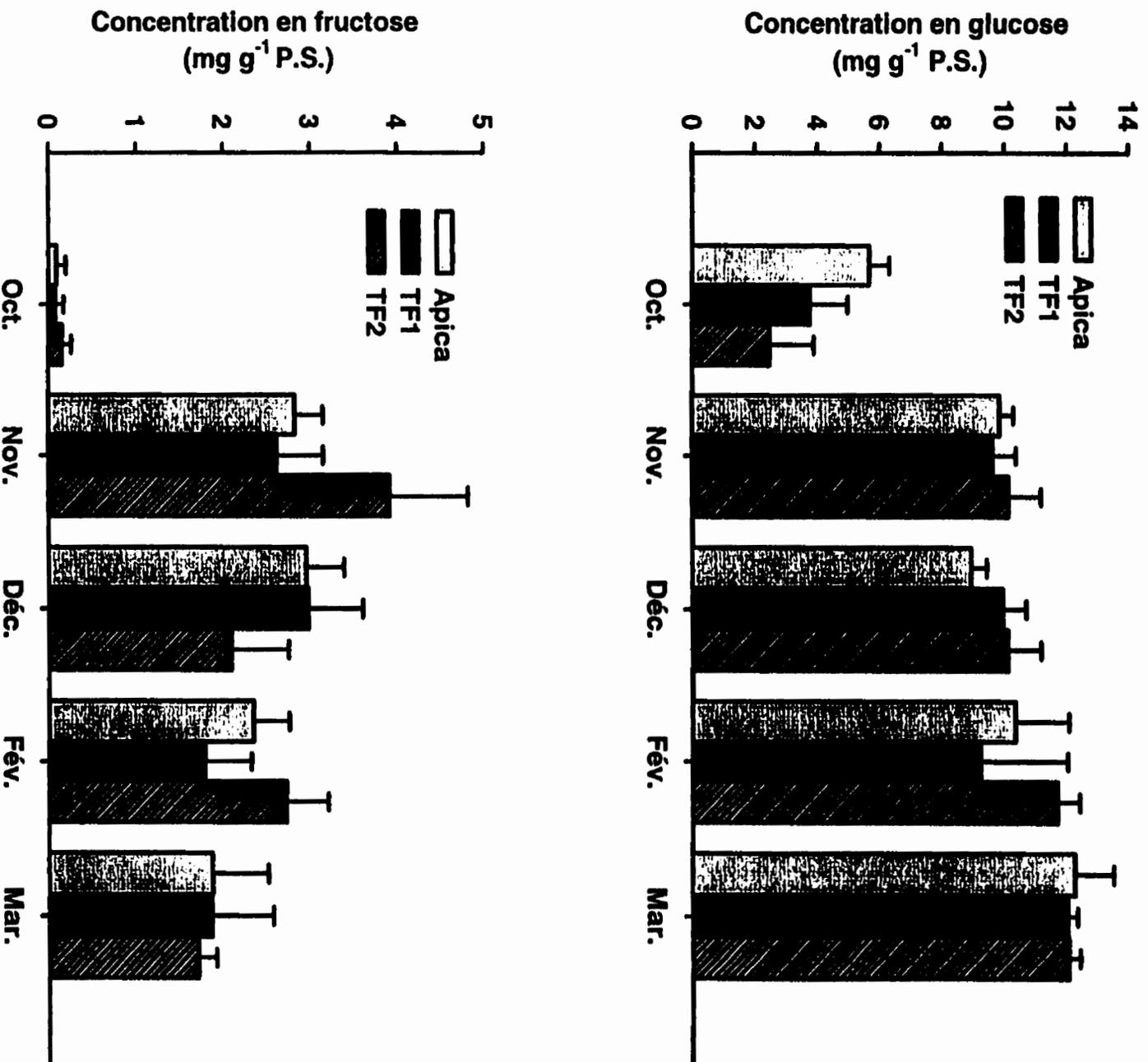


Figure 9. Évolution des niveaux a) de glucose et b) de fructose dans les collats du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées ( $n=4$ ).

### **3.3.4 Expression génétique**

L'exposition aux basses températures a accru de façon importante l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* (Figure 10). Le niveau d'expression du gène *msaCIA*, mesuré dans les collets par la technique Northern Blot, est passé d'approximativement 700 « Counts per minute » (CPM) à 3500 CPM entre le mois d'octobre et le mois de novembre. Ces niveaux d'expression se sont maintenus élevés pendant toute la saison pour décroître légèrement vers la fin de l'hiver. Les résultats obtenus montrent une différence significative entre Apica et TF2 au mois d'octobre seulement. L'expression du gène *msaCIA* coïncide avec le patron d'évolution de la tolérance au gel. Ce gène pourrait être impliqué à la fois dans l'acquisition et le maintien de la tolérance au gel chez la luzerne. Le niveau d'expression du gène *msaCIC* est passé quant à lui d'approximativement 50 CPM à 450 CPM après un mois d'acclimatation soit une augmentation de 9X. Les niveaux des transcrits de ce gène ont par la suite diminué tout au long de l'hiver. Nos résultats n'ont révélé aucune différence significative entre Apica, TF1 et TF2 lors des cinq échantillonnages. Les niveaux d'expression indiquent que ce gène pourrait être impliqué uniquement dans l'acquisition de la tolérance au gel.

Les résultats de cette expérience n'ont montré aucune différence significative entre les populations sélectionnées et le cultivar d'origine en ce qui a trait à l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC*. La sélection sous des stress successifs de congélation n'a pas influencé les niveaux d'expression de ces deux gènes. Ces résultats ne coïncident pas avec ceux de Castonguay *et al.* (1993). Leurs analyses de l'accumulation des produits de transcription des gènes *msaCIA* et *msaCIC* dans les collets montraient une accumulation supérieure de ces produits chez un cultivar de luzerne tolérant au gel (Apica) comparativement à un cultivar sensible (CUF-101). Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par le fait que Castonguay *et al.* (1993) ont utilisé des cultivars dont le niveau de tolérance au gel était nettement plus distinct que ceux de la présente étude. Il demeure possible qu'une expression différentielle de ces gènes entre Apica, TF1 et TF2 ne puisse survenir que pour une courte période de temps lors de l'acclimatation des plantes et que les échantillonnages aient été trop distancés pour permettre d'observer ce phénomène.

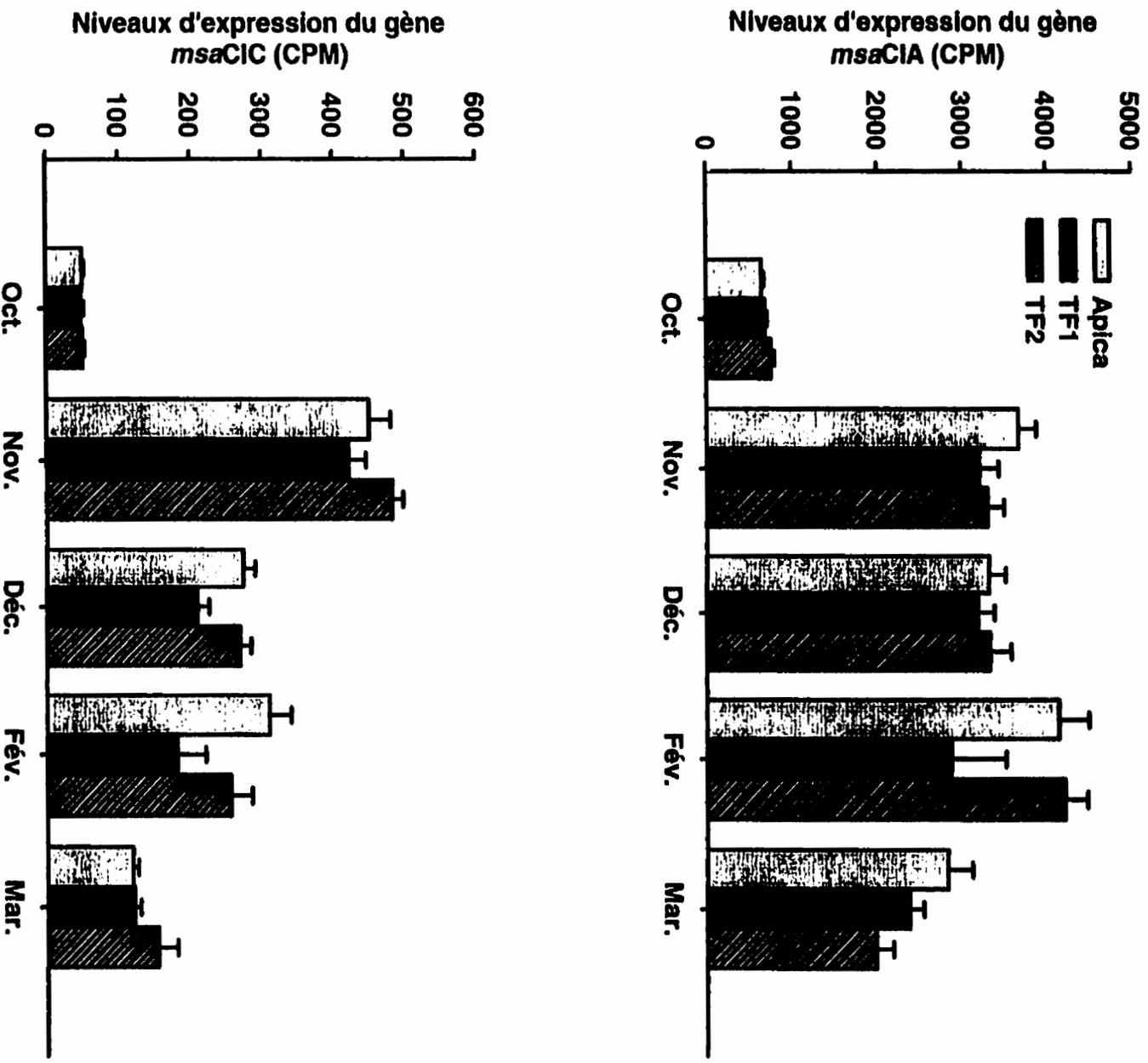


Figure 10. Expression des gènes a) *msaCIA* et b) *msaCIC* dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées en serre non chauffée. Les prélèvements ont été effectués à cinq reprises au cours de l'hiver 1996-97. Les erreurs-types sont indiquées (n=4).

### 3.4 Expérience en aire de propagation

Cette expérience a été réalisée sous des conditions contrôlées au lieu d'une serre non chauffée afin de réduire la variabilité environnementale. L'objectif était de comparer l'accumulation des hydrates de carbone et l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* au niveau foliaire et au niveau des collets. De plus, une analyse comparative de la distribution de 100 génotypes du cv Apica et de 100 génotypes de chacune des populations TF1 et TF2 a été effectuée en fonction de l'accumulation du raffinose et du saccharose ainsi que de l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC*.

#### 3.4.1 Résultats du prélèvement foliaire

##### 3.4.1.1 Hydrates de carbones

Le stachyose n'est présent qu'à un très faible niveau dans les feuilles chez des plantes de luzerne endurcies à 2°C pour une période de 2 semaines. Cependant, on y retrouve du raffinose, du saccharose, du glucose ainsi que du fructose à des concentrations qui se situent respectivement à près de 4, 22, 24 et de 22 mg g<sup>-1</sup> PS (Figure 11). Aucune différence significative n'a été observée entre Apica, TF1 et TF2 en ce qui a trait aux niveaux des sucres solubles dans la partie foliaire des plantes. Selon Castonguay *et al.* (1998b), l'exposition des plantes au froid (2°C pour une période de 2 semaines) favorise l'accumulation des sucres au niveau des feuilles chez la luzerne. Ces auteurs ont également démontré qu'il est possible de différencier des cultivars de rusticité différente grâce à la concentration différentielle du raffinose au niveau foliaire. Les résultats obtenus montrent, cependant, que le niveau de ces sucres a été similaire entre Apica, TF1 et TF2. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'il ne s'agit pas de cultivars de rusticité aussi différente que ceux utilisés par Castonguay *et al.* (1998b) mais plutôt de populations générées à partir d'un même cultivar. De plus, nos résultats obtenus en serre non chauffée avec des collets ont démontré qu'une concentration différentielle de raffinose est observée seulement après une période de 3 mois d'endurcissement. Une exposition de 2 semaines à 2°C n'a sans doute pas été suffisante pour atteindre un niveau de raffinose assez élevé pour différencier Apica, TF1 et TF2.

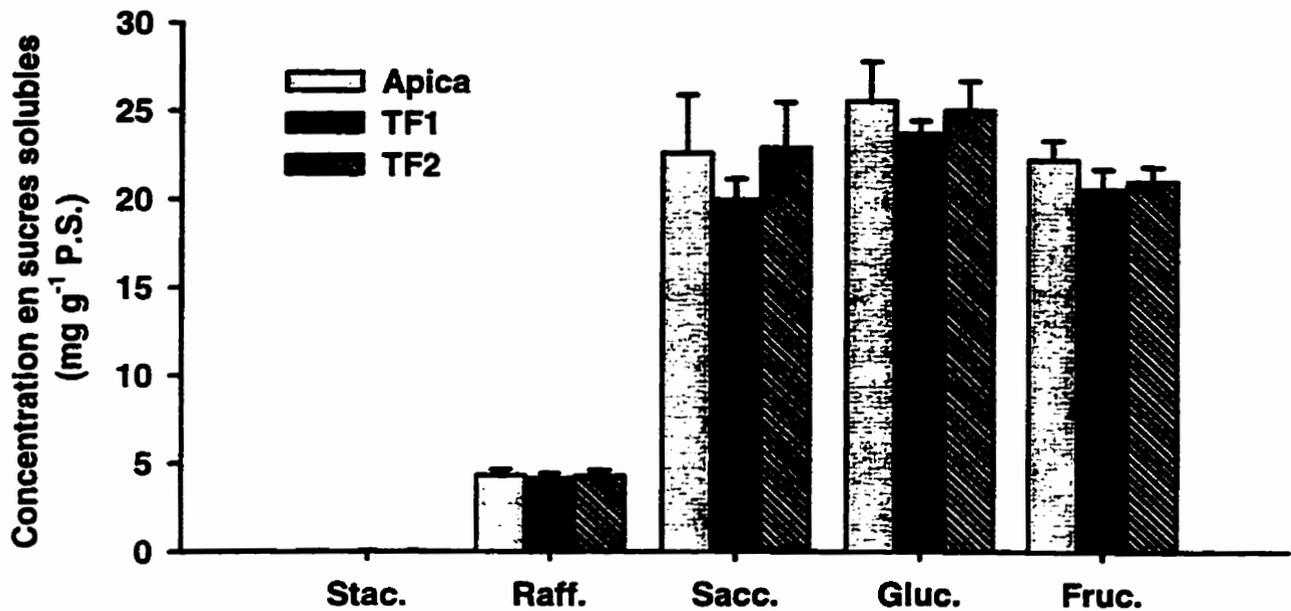


Figure 11. Teneur en sucres solubles au niveau foliaire chez le cv Apica et les populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=100).

La distribution de 100 génotypes du cv Apica et de 100 génotypes de chacune des populations en fonction des niveaux de raffinose permet d'observer une légère asymétrie positive chez les populations TF1 et TF2 comparativement au cv Apica (Figure 12). Un plus grand nombre de génotypes contenant des quantités élevées de raffinose, soit entre 8 et 14 mg g<sup>-1</sup> PS, a été observé chez les populations sélectionnées pour leur tolérance au gel. Ces changements au niveau de la distribution des génotypes n'ont pas été observés pour le saccharose (Figure 12). Les résultats obtenus montrent une distribution similaire du saccharose entre les génotypes du cv Apica et ceux des populations sélectionnées. La sélection sous des stress successifs de

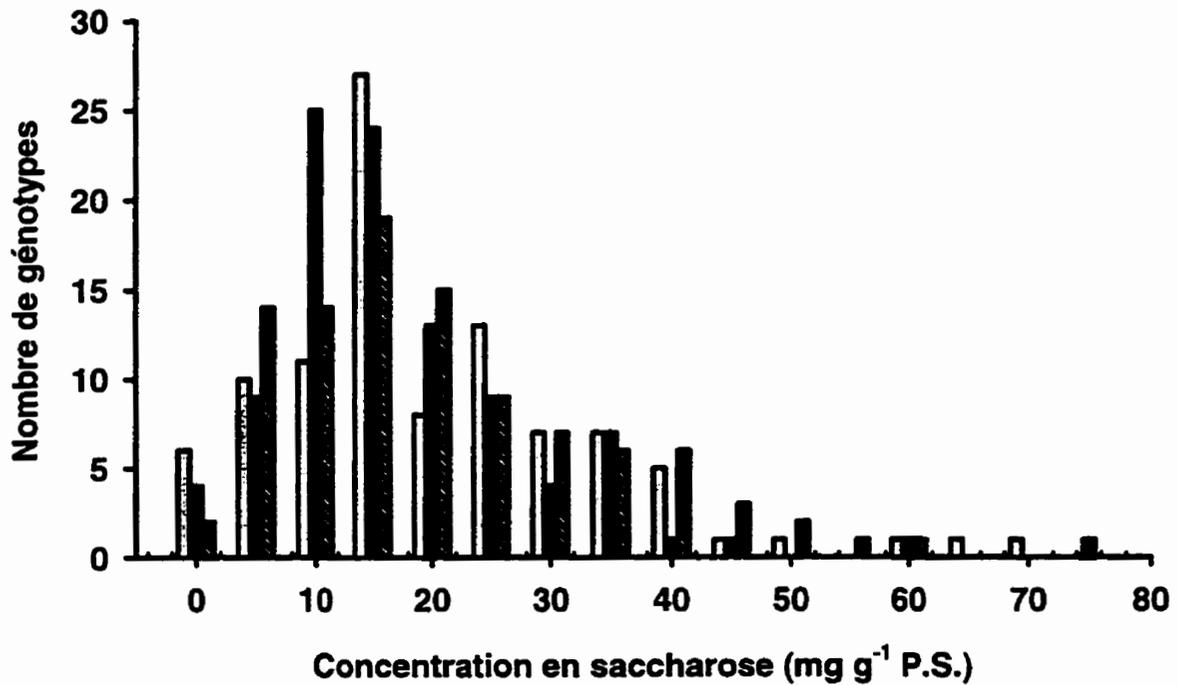
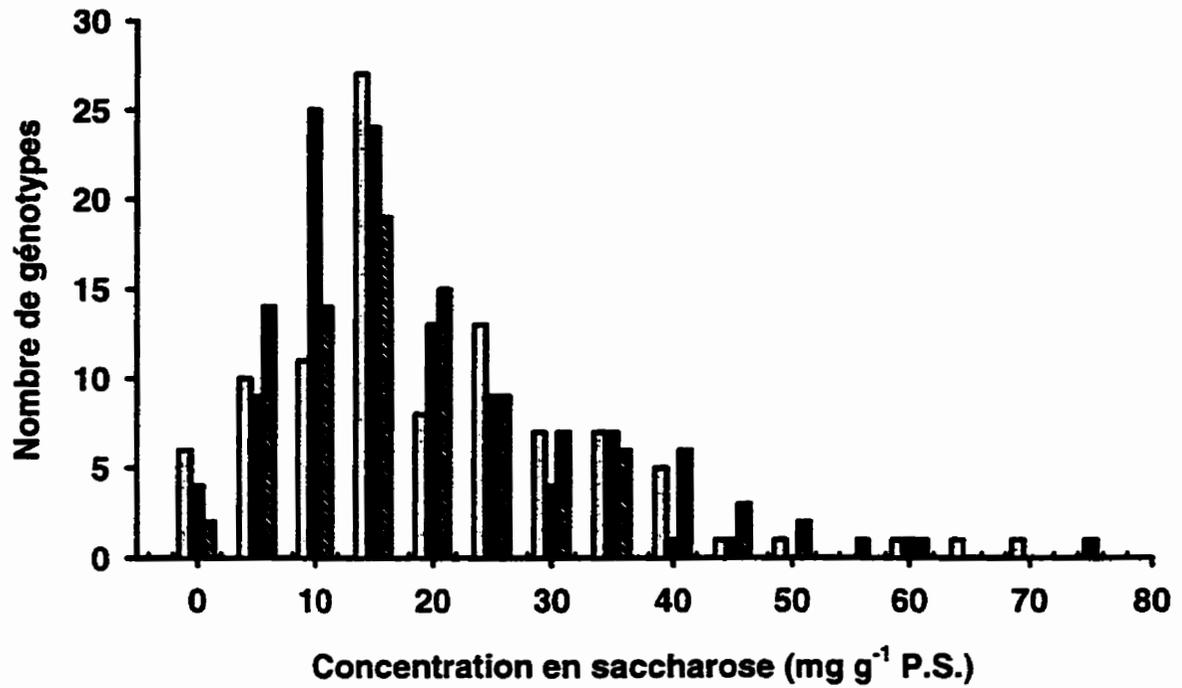


Figure 12. Distribution de 100 génotypes du cv Apica et de 100 génotypes pour chacune des populations TF1 et TF2 en fonction du contenu en a) raffinose et en b) saccharose dans la partie foliaire. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines.

congélation semble donc avoir eu une incidence sur l'accumulation du raffinose au niveau foliaire mais non sur celle du saccharose. Ces résultats semblent indiquer une relation indirecte entre la tolérance au gel et les niveaux de raffinose. Si cette hypothèse est exacte, une sélection pour des concentrations plus élevées en raffinose pourrait permettre l'identification de géotypes plus tolérants aux basses températures. De plus, les courbes de distribution obtenues montrent que la variabilité génétique de ce caractère biochimique est plus importante chez les populations sélectionnées. Une sélection pour des concentrations supérieures de raffinose chez ces dernières aurait donc plus d'effet sur la tolérance au gel qu'une sélection chez Apica.

#### **3.4.1.2 Expression génétique**

Les niveaux moyens des transcrits du gène *msaCIA* ont été de 1996 CPM, 1928 CPM et 1828 CPM, tandis que ceux du gène *msaCIC* ont été de 61 CPM, 58 CPM et de 55 CPM chez Apica, TF1 et TF2 respectivement (Figure 13). Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative entre Apica, TF1 et TF2 en ce qui a trait au niveau d'expression de ces gènes dans les feuilles. Deux explications possibles à ces résultats seraient que l'acclimatation des plantes à 2°C n'a pas été suffisante pour permettre l'expression différentielle de ces gènes ou que l'expression de ces gènes n'a pas été influencée par la sélection sous des stress successifs de congélation.

La distribution des niveaux d'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* chez 100 géotypes du cv Apica et de chacune des populations sélectionnées a été similaire (Figure 14). Une distribution asymétrique vers la droite a été observée chez Apica et les deux populations.

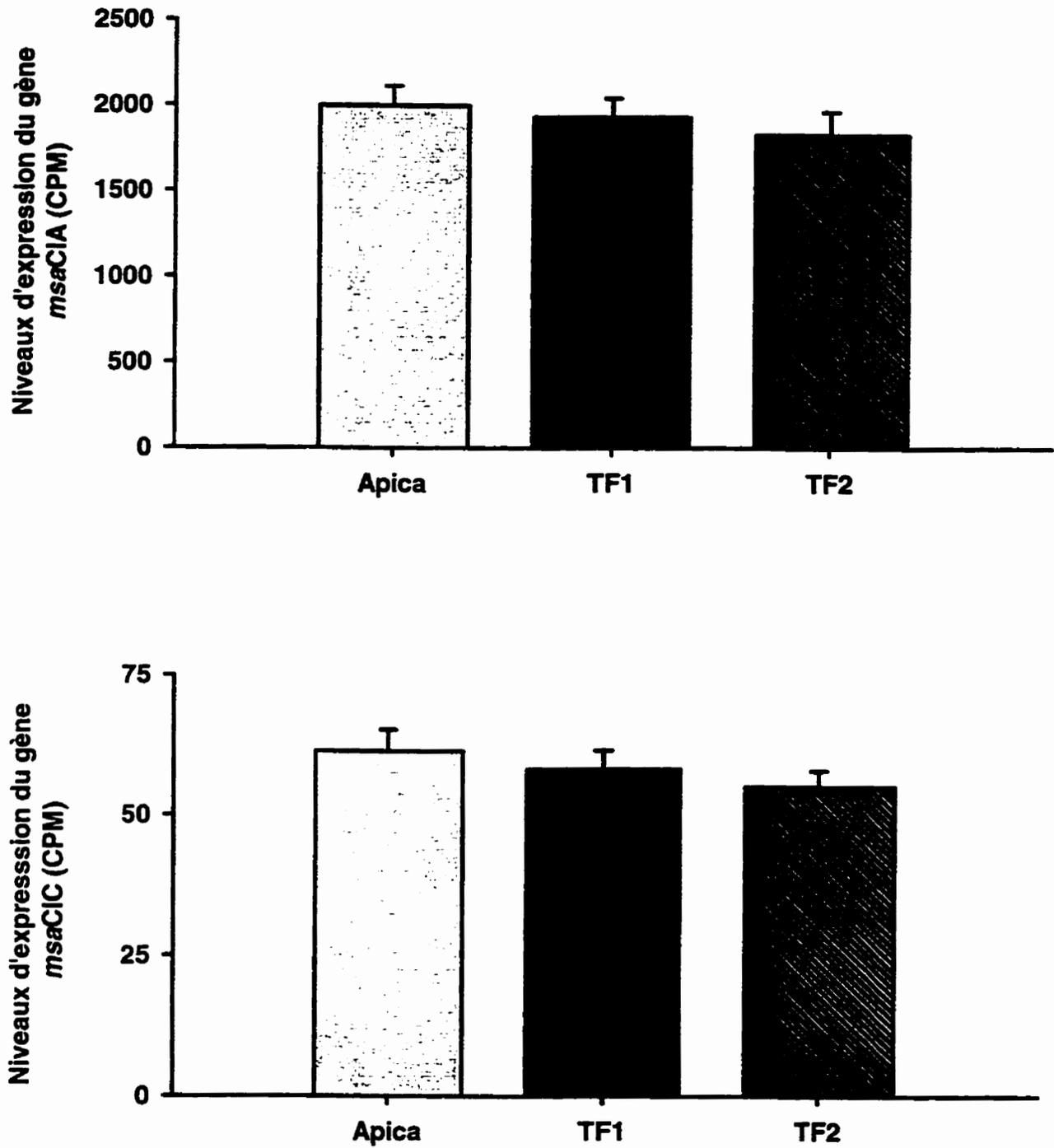


Figure 13. Expression des gènes a) *msaCIA* et b) *msaCIC* au niveau foliaire chez le cv Apica et les populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=100).

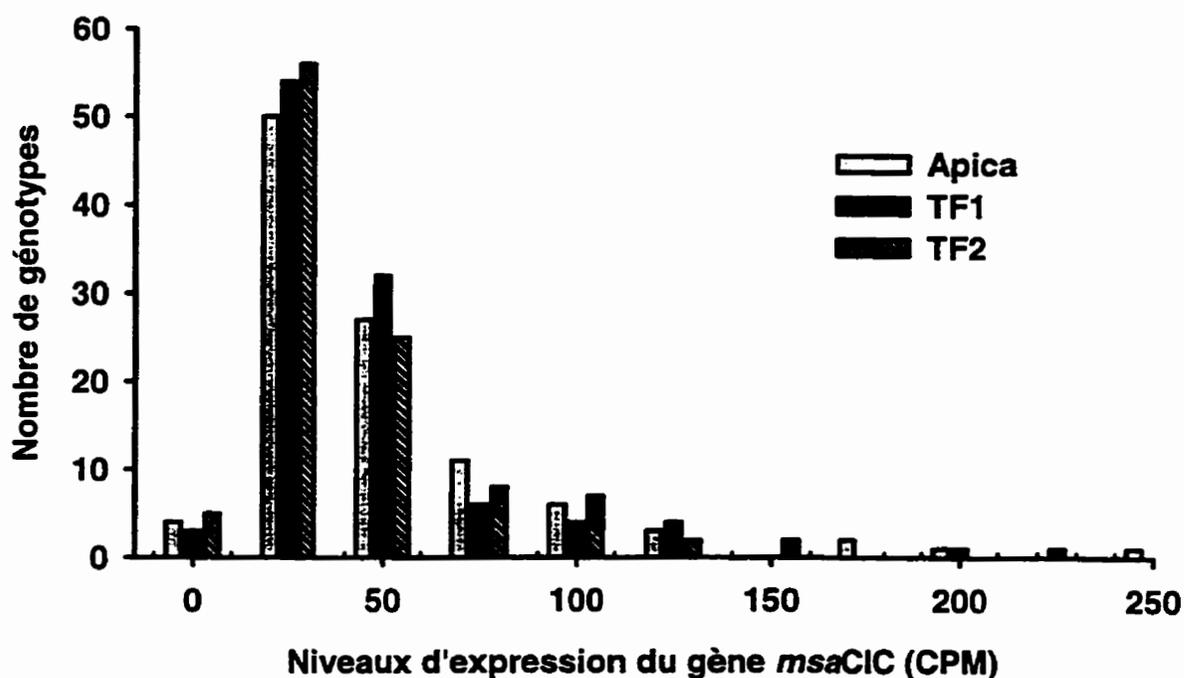
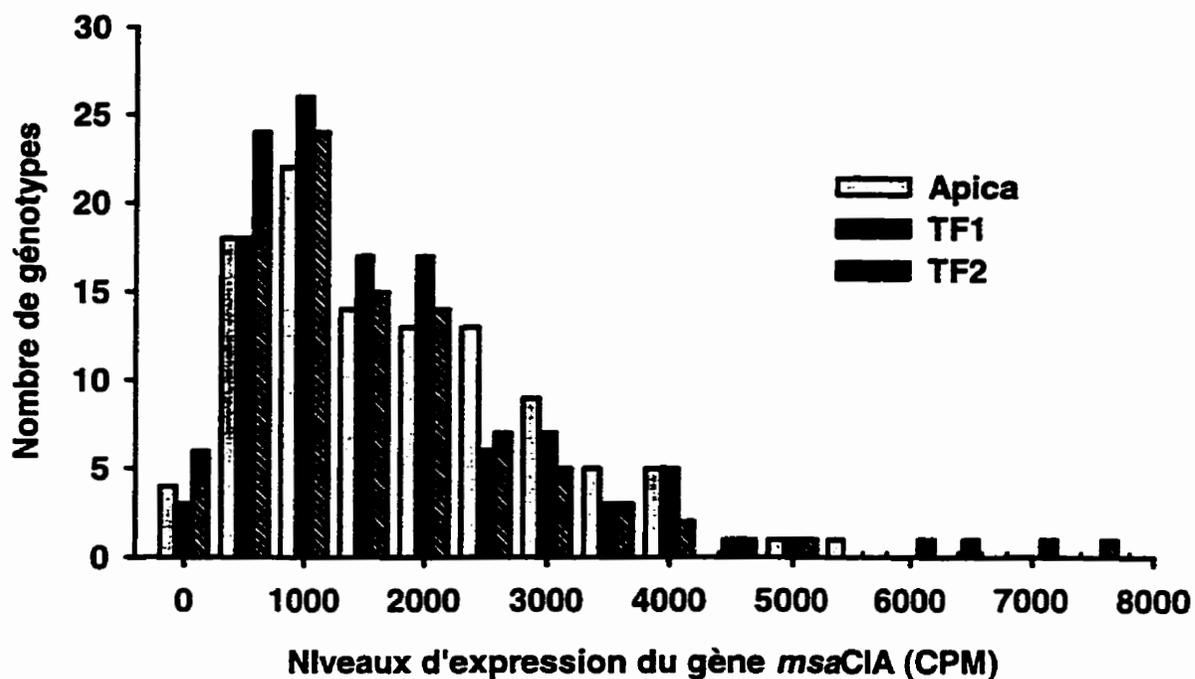


Figure 14. Distribution de 100 génotypes du cv Apica et de 100 génotypes pour chacune des populations TF1 et TF2 en fonction de l'expression des gènes a) *msaCIA* et b) *msaCIC* au niveau foliaire. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines.

### **3.4.2 Résultats du prélèvement au niveau des collets.**

#### **3.4.2.1 Hydrates de carbone**

Les deux populations sélectionnées ont démontré une réponse similaire à celle de la population d'origine en ce qui a trait à l'accumulation de l'amidon (Figure 15). Cependant, les niveaux d'amidon baissent légèrement entre Apica, TF1 et TF2, ce qui coïncide avec une augmentation des niveaux de saccharose. L'exposition aux basses températures a induit une accumulation significativement supérieure de saccharose au niveau des collets chez TF2 comparativement à Apica (Figure 15). Les niveaux de ce sucre augmentent légèrement (Apica, TF1 et TF2) en relation avec le nombre de cycles de sélection appliqués aux plantes. Aucune autre différence significative n'a été observée en ce qui a trait à l'accumulation des oligosaccharides et des monosaccharides au niveau des collets (Figure 15).

Une comparaison des résultats de cette expérience avec ceux de l'expérience en serre non chauffée, révèle plusieurs similitudes. Les niveaux d'amidon, de glucose et de fructose dans les collets des plantes acclimatées en conditions contrôlées ont été similaires à ceux enregistrés au mois d'octobre chez les plantes non endurcies. L'acclimatation en conditions contrôlées n'a donc pas permis de modifier les niveaux d'accumulation de ces sucres dans les collets. Cependant, si l'on observe l'accumulation des sucres cryoprotecteurs (saccharose, raffinose et stachyose), on note des accroissements de leurs niveaux dans les collets des plantes acclimatées en conditions contrôlées, similaires à ceux observés sur les collets des plantes acclimatées un mois en serre non chauffée. Selon Castonguay *et al.* (1998a), les plantes acclimatées en serre non chauffée accumulent des niveaux de raffinose et de stachyose beaucoup plus élevés que celles acclimatées sous des conditions contrôlées. Les résultats obtenus sont en accord avec ces travaux. Cependant, on peut penser qu'une plus longue période d'acclimatation en conditions contrôlées pourrait permettre d'atteindre des niveaux beaucoup plus élevés de stachyose et de raffinose.

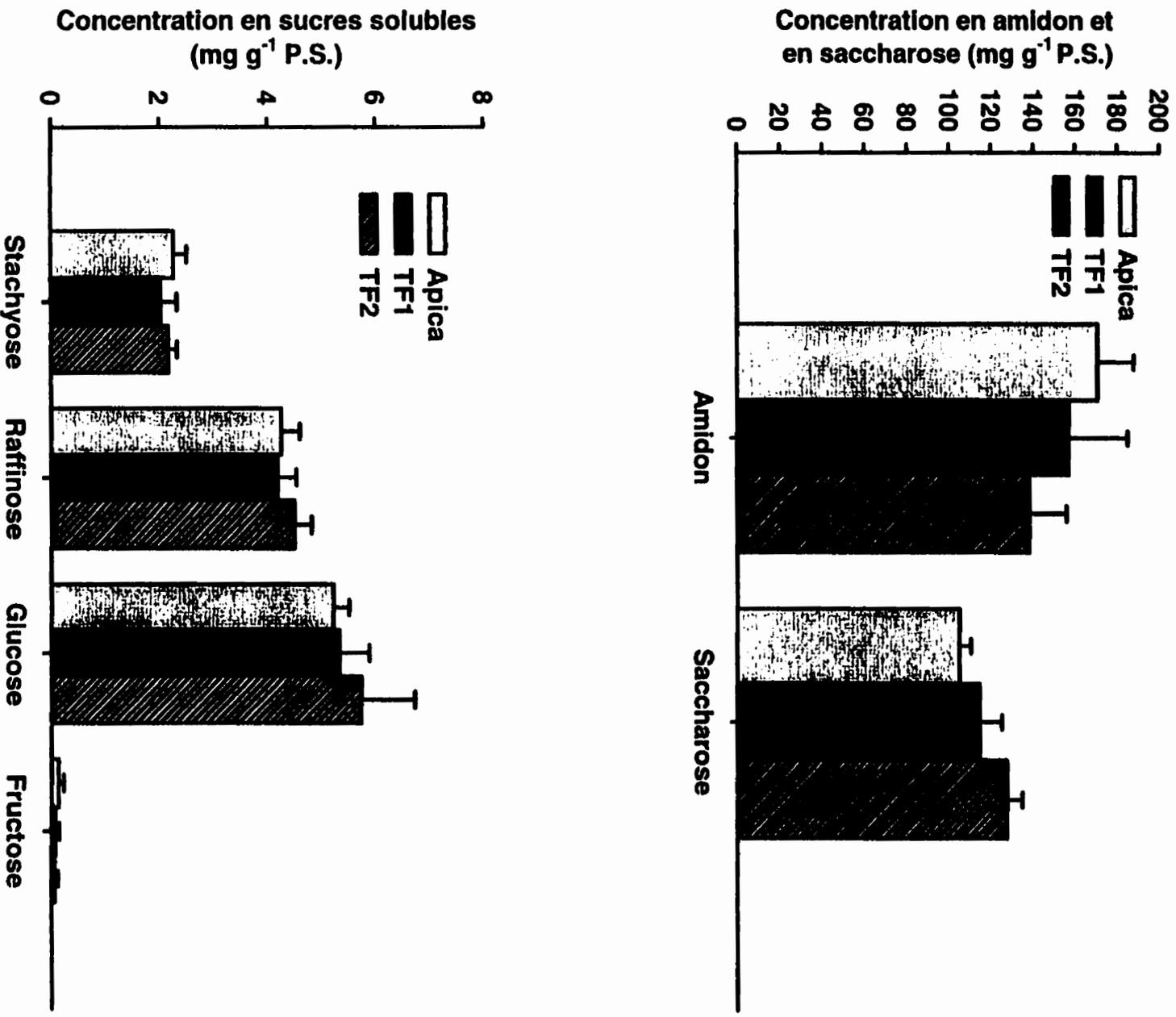


Figure 15. Teneur en hydrates de carbone dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines et à -2°C pour une période supplémentaire de 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (n=7).

L'acclimatation des plantes en conditions contrôlées n'a pas permis de différencier les populations sélectionnées de la population d'origine sur la base de leur accumulation en oligosaccharides de la famille du raffinose au niveau des collets. Cependant, ces résultats corroborent l'observation d'une différence significative dans les teneurs en saccharose entre Apica, TF1 et TF2 lors de la phase initial d'endurcissement à l'automne. Le saccharose est un sucre cryoprotecteur susceptible de jouer un rôle adaptatif important. L'approche de sélection utilisée semble avoir permise de modifier ce caractère et pourrait être relié aux différences de tolérance au gel entre les populations.

#### 3.4.2.2 Expression génétique

Les populations sélectionnées ont été similaires au cv Apica en ce qui a trait à l'expression du gène *msaCIA* (Figure 16). Cependant, les résultats obtenus montrent une différence significative entre les deux populations sélectionnées. Le niveau moyen des transcrits de ce gène a été significativement supérieur chez TF2 comparativement à TF1. Ces résultats ne coïncident pas avec ceux obtenus lors de l'expérience en serre non chauffée. Cette différence significative s'explique difficilement. Il est possible qu'une analyse ponctuelle ne permette pas d'évaluer adéquatement l'expression de ce gène. D'autres travaux seront donc nécessaires pour expliquer ou du moins confirmer les résultats obtenus lors de cette expérience.

Pour ce qui est du niveau de transcrits du gène *msaCIC*, il a été similaire entre Apica, TF1 et TF2 (Figure 16). Ces résultats coïncident avec ceux obtenus lors de l'expérience en serre non chauffée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'acclimatation des plantes à 2°C puis à -2°C n'a pas été suffisante pour permettre l'expression différentielle de ce gène ou que la sélection sous des stress successifs de congélation n'a pas influencée l'expression du gène *msaCIC*.

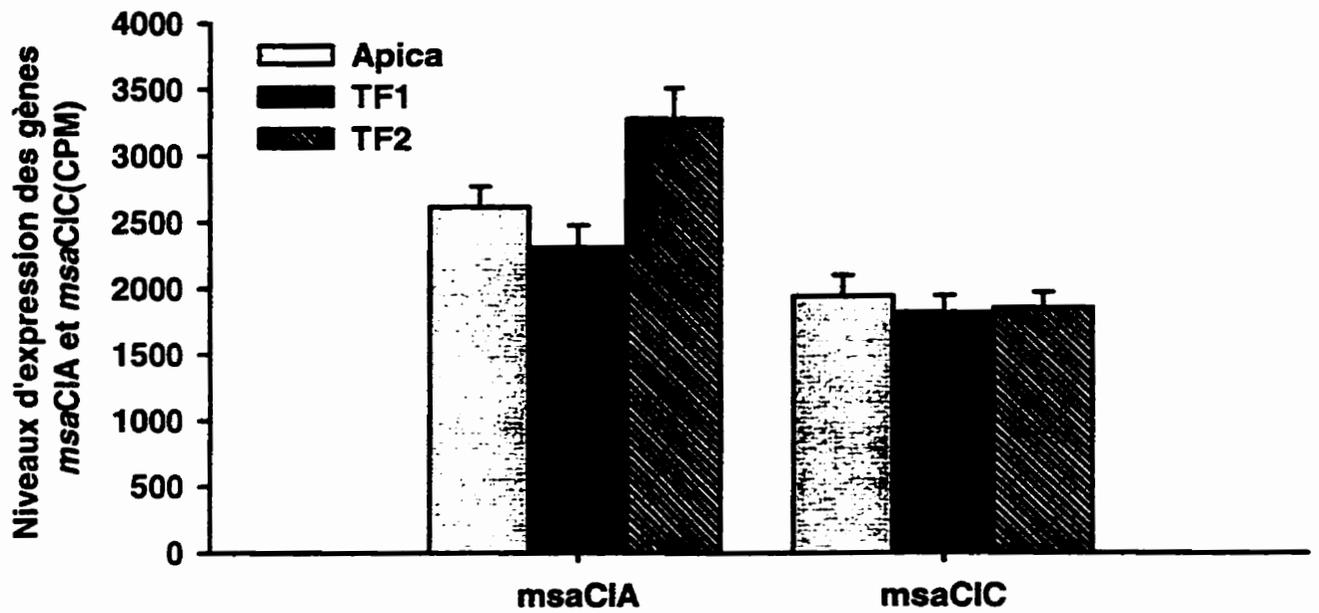


Figure 16. Expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* dans les collets du cv Apica et des populations TF1 et TF2. Les plantes ont été acclimatées à 2°C pendant 2 semaines et à -2°C pour une période additionnelle de 2 semaines. Les erreurs-types sont indiquées (N=7).

## CONCLUSION

La tolérance au gel est le facteur principal contribuant à la persistance de la luzerne (*Medicago sativa*) exposée à des conditions hivernales rigoureuses. Dans ce travail, nous avons voulu évaluer l'efficacité d'une méthode de sélection utilisant des stress successifs de congélation sur l'amélioration de la tolérance au gel de la luzerne. Dans un premier temps, nous avons évalué la tolérance au gel et le regain des populations issues de l'intercroisement de génotypes sélectionnés pour leur tolérance supérieure au gel. Par la suite, nous avons évalué l'effet de cette sélection sur l'accumulation de sucres solubles ainsi que sur l'accumulation des transcrits de deux gènes régulés par le froid, *msaCIA* et *msaCIC*, dont l'expression est étroitement liée au niveau de tolérance au gel de la luzerne. Finalement, nous avons évalué l'effet de cette approche de sélection sur la dormance automnale et sur la survie à l'hiver des populations sélectionnées.

Les résultats des travaux effectués en serre non chauffée ont montré que cette méthode de sélection permet d'abaisser la température létale de la luzerne et d'augmenter le regain après le gel. Nous avons également observé une augmentation progressive de la tolérance au gel avec

le nombre de cycles de sélection. L'approche de sélection basée sur des stress successifs de congélation a permis aussi d'augmenter la teneur en sucres cryoprotecteurs au niveau des collets. À la mi-hiver, les niveaux de raffinose et de stachyose ont été supérieurs chez les populations sélectionnées comparativement au cultivar d'origine. Cette augmentation est associée au nombre de cycles de sélection. Lors des expériences en conditions contrôlées les travaux effectués au niveau foliaire chez les plantes acclimatées 2 semaines à 2°C n'ont montré aucun effet de la sélection sur l'accumulation des sucres solubles. Cependant, l'analyse de la distribution du raffinose semble indiquer qu'un plus grand nombre de géotypes possèdent une plus haute teneur en raffinose au niveau foliaire chez TF1 et TF2 comparativement au cultivar d'origine. Les travaux effectués au niveau des collets chez les plantes acclimatées 2 semaines à 2°C suivies de 2 semaines à -2°C ont montré un effet de la sélection sur l'accumulation du saccharose uniquement. Ce sucre pourrait jouer un rôle adaptatif important et être relié aux différences de tolérance au gel observées entre les populations. L'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* n'a pas été modifiée par cette approche de sélection tant lors de l'expérience en serre non chauffée que lors des expériences en conditions contrôlées. Aucune conclusion définitive n'a pu être présentée quant à la dormance automnale et la survie à l'hiver des populations sélectionnées puisque les conditions climatiques qui ont prévalu lors de l'hiver 1996-97 ont détruit les parcelles au site de Plessisville. Par conséquent, les données recueillies sur un seul site sont très limitées. Un nouveau semis effectué à trois sites au printemps 1997 permettra d'obtenir plus d'information. Néanmoins, les résultats de cette étude indiquent que la sélection sous des stress successifs de congélation permet de générer des populations de tolérance au gel supérieure et peut-être par le fait même d'améliorer la persistance des cultivars à haute valeur agronomique. Ceci permettrait d'accroître la culture de la luzerne sous nos conditions de production, de diminuer les coûts reliés à la réimplantation hâtive et à l'achat de suppléments pour l'alimentation animale suite à des dommages hivernaux importants dans les luzernières.

Les conclusions présentées à la lumière des résultats ouvrent les portes à d'autres perspectives de recherche parmi lesquelles on peut suggérer :

- de poursuivre les cycles de sélection et de caractériser les populations TF3 et TF4 en ce qui à trait à la tolérance au gel et à la survie à l'hiver ;
  
- d'effectuer une sélection en utilisant comme critère de sélection l'accumulation des sucres cryoprotecteurs (raffinose et stachyose) étant donné leur étroite relation avec l'acquisition de la tolérance au gel ;
  
- d'effectuer une sélection en utilisant comme critère de sélection les gènes *msaCIA* et *msaCIC* étant donné l'expression différentielle de ces gènes chez des cultivars de luzerne de rusticité différente ;
  
- de mettre au point une méthode d'acclimatation rapide, non destructive et qui permet d'optimiser l'expression du potentiel d'acclimatation au froid dans des populations à haute valeur agronomique.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Andrews, C.J. 1987. Low-temperature stress in field and forage crop production - an overview. *Can. J. Plant Sci.* 67 : 1121-1133.

Barnes, D.K., E.T. Bingham, R.P. Murphy, D.F. Beard, W.H. Skrdla et L.R. Teuber. 1977. Alfalfa germplasm in the United States : genetic vulnerability, use, improvement, and maintenance. Technical Bulletin 1571, United States Department of Agriculture, 21pp.

Barnes, D.K., B.P. Goplen et J.E. Baylor. 1988. Highlights in the USA and Canada. Dans : Hanson, A.A., D.K. Barnes et R.R. Hill Jr., eds., *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA, Agronomy monograph No 29, pp. 1-24.

Barnes, D.K., D.M. Smith, R.E. Stucker et L.J. Elling. 1979. Fall dormancy in alfalfa : a valuable predictive tool. Dans : *Report of the 26<sup>th</sup> Alfalfa Improvement Conference*. Agricultural Reviews and Manuals, Science and Education Administration, U.S.D.A., St. Paul, 34 pp.

Barnes, D.K., D.M. Smith, L.R. Teuber, M.A. Peterson et M.H. McCaslin. 1995. Fall dormancy. Dans : Fox, C.C., 3<sup>e</sup> eds., *Standard tests to characterize alfalfa cultivars*, pp.A-1.

Barta, A.L. 1980. Regrowth and alcohol dehydrogenase activity in waterlogged alfalfa and birdsfoot trefoil. *Agron. J.* 72 : 1017-1020.

Bertrand, A. et R. Paquin. 1991. Influence de la température d'endurcissement sur la tolérance au gel de la luzerne et sa teneur en sucres, amidon et proline. *Can. J. Plant Sci.* 71 : 737-747.

Beuselinck, P.R., J.H. Bouton, W.O. Lamp, A.G. Matches, M.H. McCaslin, C.J. Nelson, L.H. Rhodes, C.C. Sheaffer et J.J. Volenec. 1994. Improving legume persistence in forage crop systems. *J. Prod. Agric.* 7 : 311-322.

Blackman, S.A., R.L. Obendorf et A.C. Leopold. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 100 : 225-230.

Blakeney, A.B. et L.L. Mutton. 1980. A simple colorimetric method for the determination of sugar in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 31 : 889-897.

Bowley, S.R. et B.D. McKersie. 1990. Relationship among freezing, low temperature flooding, and ice encasement tolerance in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 70 : 227-235.

Bruni, F.B. et A.C. Leopold. 1991. Glass transitions in soybean seed. Relevance to anhydrous biology. *Plant Physiol.* 96 : 660-663.

Bula, R.J. et D. Smith. 1954. Cold resistance and chemical composition in overwintering alfalfa, red clover, and sweetclover. *Agron. J.* 46 : 397-401.

Busbice, T.H. et C.P. Wilsie. 1965. Fall growth, winterhardiness, recovery after cutting and wilt resistance in F<sub>2</sub> progenies of Vernal × DuPuits alfalfa crosses. *Crop Sci.* 5 : 429-432.

Buxton, D.R. 1989. Major edaphic and climatic stresses in the United States. pp. 217-232. Dans : G.C. Marten, *et al.* (ed.), Persistence of forage legumes. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.

- Caffrey, M., V. Fonseca et A.C. Leopold. 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiol.* 86 : 754-758.
- Calder, F.W. et L.B. MacLeod. 1966. Effect of cold treatment on alfalfa as influenced by harvesting system and rate of potassium application. *Can. J. Plant Sci.* 46 : 17-26.
- Castonguay, Y. et A. Guckert. 1996. Adaptation of forage legumes to cold climates. *Grassland and Land Use System, Proceedings of the 16<sup>th</sup> meeting; European Grassland Federation.* pp. 911-917.
- Castonguay, Y., S. Laberge, P. Nadeau et L.-P. Vézina. 1994. A cold-induced gene from *Medicago sativa* encodes a bimodular protein similar to developmentally regulated proteins. *Plant Mol. Biol.* 24 : 799-804.
- Castonguay, Y., S. Laberge, P. Nadeau et L.-P. Vézina. 1997a. Temperature and drought stress. Dans : McKersie, B.D. et D.W. Brown (eds). *Biotechnology and the improvement of forage legumes.* CAB International, pp. 175-202.
- Castonguay, Y. et P. Nadeau. 1998. Enzymatic control of soluble carbohydrate accumulation in cold-acclimated crowns of alfalfa. (sous presse).
- Castonguay, Y., P. Nadeau et S. Laberge. 1993. Freezing tolerance and alteration of translatable mRNAs in alfalfa (*Medicago sativa* L.) hardened at subzero temperatures. *Plant Cell Physiol.* 34 : 31-38.
- Castonguay, Y., P. Nadeau, S. Laberge et L.-P. Vézina. 1997b. Changes in gene expression in six alfalfa cultivars acclimated under winter hardening conditions. *Crop Sci.* 37 : 332-342.
- Castonguay, Y., P. Nadeau, P. Lechasseur et L. Chouinard. 1995. Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. *Crop Sci.* 35 : 509-516.

Castonguay, Y., P. Nadeau et R. Michaud. 1998. Differential accumulation of oligosaccharides and freezing tolerance of alfalfa. Dans : Li, P.H. et T.H.H. Chen (eds). Plant cold hardiness. Plenum Press, New York, pp. 293-299.

Certified Alfalfa Seed Council. 1996. Fall dormancy and pest resistance ratings of alfalfa varieties. 1995/96 Edition.

Chen, Y. et J.S. Buris. 1990. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behaviour in maturing maize seed. *Crop Sci.* 30 : 971-975.

Chen, H.-H. et P.H. Li. 1980. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiol.* 65 : 1146-1148.

Cloutier, Y. et D. Siminovitch. 1982. Correlation between cold- and drought-induced frost in winter wheat and rye varieties. *Plant Physiol.* 69 : 256-258.

Courtois, J.E. et F. Percheron. 1971. Distribution of monosaccharides, oligosaccharides and polyols. Dans Harborne, J.B., D. Boulter et B.L. Turner (eds). *Chemotaxonomy of the leguminosae*. New York, Academic Press. pp. 207-229.

C.P.V.Q. 1989. *Plantes fourragères-culture*. Gouvernement du Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. 251pp.

Crowe, J.H., J.F. Carpenter, L.M. Crowe et T.J. Anchordoguy. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vector ? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27 : 219-231.

Crowe, J.H. et L.M. Crowe. 1992. Membrane integrity in anhydrobiotic organisms : toward a mechanism for stabilizing dry cells. Dans : Somero, G.N., C.B. Osmond et C.L. Bolis (eds). *Water and life*. Springer-Verlag, New York, pp. 87-103.

- Crowe, J.H., L.M. Crowe et R. Mouradian. 1983. Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology*. 20 : 346-356.
- Devlin, R.M. et F.H. Witham. 1983. *Plant physiology*. PWS Publishers. Willard Grant Press, Boston. 577 pp.
- DeVries, S., H. Hoge et T. Bisseleing. 1988. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual B6* : 1-13.
- Dexter, S.T., W.E. Tottingham et L.F. Graber. 1930. Preliminary results in measuring the hardiness of plants. *Plant Physiol*. 5 : 215-223.
- Dey, P.M. 1990. Oligosaccharides. Dans : Dey, P.M., J.B. Harborne (éd.). *Methods in plant biochemistry*, Vol. 2. Academic Press, San Diego, CA, pp. 189-218.
- Duke, S.H. et D.C. Doehlert. 1981. Root respiration, nodulation, and enzyme activities in alfalfa during cold acclimation. *Crop Sci*. 21 : 489-494.
- Elliott, C.R., P.B. Hoyt, M. Nyborg et B. Siemens. 1973. Sensitivity of several species of grasses and legumes to soil acidity. *Can. J. Plant Sci*. 53 : 113-117.
- Gasser, H. et C. Willemot. 1974. Amélioration génétique de la luzerne à la résistance au froid après une génération de sélection. *Can. J. Plant Sci*. 54 : 833-834.
- Gervais, P. et M. Bilodeau. 1985. Influence des régimes d'exploitation sur le rendement, le peuplement, les réserves nutritives et la composition chimique de la luzerne. *Can. J. Plant Sci*. 65 : 553-564.

Gervais, P. et J.M. Girard. 1987. Influence de la hauteur et de la fréquence des coupes sur le rendement, le peuplement, la composition chimique et les réserves nutritives de la luzerne. *Can. J. Plant Sci.* 67 : 735-746.

Gusta, L.V., M.J. Burke et A.C. Kapoor. 1975. Determination of unfrozen water in winter cereals at subfreezing temperatures. *Plant Physiol.* 56 : 707-709.

Gusta, L.V. et D. B. Fowler. 1979. Cold resistance and injury in winter cereals. Dans : Mussel, R. et R.C. Staples (éd.). *Stress physiology in crop plants*. John Wiley & Sons, New York, pp. 159-178.

Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance : role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41 : 187-223.

Guy, C.L. et D. Haskell. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* 84 : 872-878.

Harper, A.M. et S. Freyman. 1979. Effect of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphidae), on cold-hardiness of alfalfa. *Can. Entomol.* 111 : 635-636.

Heinrichs, D.H., J.E. Troelsen et K.W. Clark. 1960. Winter hardiness evaluation in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 40 : 638-644.

Hincha, D.K. 1990. Differential effects of galactose containing saccharides on mechanical freeze-thaw damage to isolated thylakoid membranes. *Cryo-Lett.* 11 : 437-444.

Hoekstra, F.A., L.M. Crowe et J.H. Crowe. 1989. Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their contents. *Plant Cell Environ.* 12 : 83-91.

Hodgson, H.J. 1964. Effect of photoperiod on development of cold resistance in alfalfa. *Crop Sci.* 4 : 302-305.

Jung, C.A. et K.L. Larson. 1972. Cold, drought and heat tolerance. Dans : Hanson, C.H. (éd.). *Alfalfa science and technology.* Agronomy 15 : 185-209.

Jung, C.A. et D. Smith. 1959. Influence of soil potassium and phosphorus content on the cold resistance of alfalfa. *Agron. J.* 51 : 585-587.

Jung, C.A. et D. Smith. 1960. Influence of extended storage at constant low temperature on cold resistance and carbohydrate reserves of alfalfa and medium red clover. *Plant Physiol.* 35 : 123-125.

Jung, C.A. et D. Smith. 1961. Trends of cold resistance and chemical changes over winter in the roots and crowns of alfalfa and medium red clover. I. Changes in certain nitrogen and carbohydrate fractions. *Agron. J.* 53 : 359-363.

Koornneef, M., C.J. Hanhart, H. Hilhorst et C.M. Karssen. 1989. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90 : 463-469.

Koster, K.L. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 96 : 302-304.

Koster, K.L. et A.C. Leopold. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88 : 829-832.

Krasnuk, M., F.H. Witham et G.A. Jung. 1978. Hydrolytic enzyme differences in cold-tolerant and cold-sensitive alfalfa. *Agron. J.* 70 : 597-605.

- Laberge, S., Y. Castonguay et L.-P. Vézina. 1993. New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* 101 : 1411-1412.
- Larson, K.L. et D. Smith. 1963. Association of various morphological characters and seed germination with the winterhardiness of alfalfa. *Crop Sci.* 3 : 234-237.
- Leprince, O., R. Bronchart et R. Deltour. 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ.* 13 : 539-546.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press, New York, 497 pp.
- Liesenfeld, D.R., D.L. Auld, G.A. Murray et J.B. Swensen. 1986. Transmittance of winterhardiness in segregated populations of peas. *Crop Sci.* 26 : 49-54.
- Lin, T-P. et N-H. Huang. 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *J. Exp. Bot.* 45 : 1289-1294.
- Luo, M., L. Lin, R.D. Hill et S.S. Mohapatra. 1991. Primary structure of environmental stress and abscisic acid- inducible alfalfa protein. *Plant Mol. Biol.* 17 : 1267-1269.
- Luo, M., J.-H. Liu, S. Mohapatra, R.D. Hill et S.S. Mohapatra. 1992. Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J. Biol. Chem.* 267 : 15367-15374.
- MacLeod, L.B. et M. Suzuki. 1967. Effect of potassium on the content of amino acids in alfalfa and orchardgrass grown with  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  nitrogen in nutrient solution culture. *Crop Sci.* 7 : 599-605.

- Mazur, P. 1969. Freezing injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 20 : 419-448.
- McCaslin, M. et T. Woodward. 1995. Winter survival. Dans : Fox, C.C., 3<sup>e</sup> eds., *Standard tests to characterize alfalfa cultivars*, p. A-7.
- McKenzie, J.S. et G.E. McLean. 1980. Changes in the cold hardiness of alfalfa during five consecutive winters at Beaverlodge, Alberta. *Can. J. Plant Sci.* 60 : 703-712.
- McKenzie, J.S., R. Paquin et S.H. Duke. 1988. Cold and heat tolerance. Dans : A.A. Hanson *et al.* (eds). *Alfalfa and alfalfa improvement*. Agron. Monogr. 29. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI., pp. 259-302.
- McKersie B.D. et L.A. Hunt. 1987. Genotypic differences in tolerance to ice encasement, low temperature flooding, and freezing in winter wheat. *Crop Sci.* 27 : 860-863.
- Meza-Basso, L., M. Alberdi, M. Raynal, M.-L. Ferrero-Cadinanos et M. Delseny. 1986. Changes in protein synthesis in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings during a low temperature treatment. *Plant Physiol.* 82 : 733-738.
- Mohapatra, S.S., R.J. Poole et R. S. Dhindsa. 1987a. Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimation of alfalfa. *Plant Physiol.* 84 : 1172-1176.
- Mohapatra, S.S., R.J. Poole et R. S. Dhindsa. 1987b. Cold acclimation, freezing resistance and protein synthesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cultivar Saranac). *J. Exp. Bot.* 38 : 1697-1703.
- Mohapatra, S.S., R.J. Poole et R. S. Dhindsa. 1988. Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* 87 : 468-473.

Mohapatra, S.S., L. Wolfrain, R. J. Poole et R. S. Dhindsa. 1989. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiol.* 89 : 373-380.

Monroy, A.F., Y. Castonguay, S. Laberge, F. Sarhan, L.-P. Vézina et R.S. Dhindsa. 1993. A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol.* 102 : 873-879.

Ooms, J.J.J., K.M. Léon-Kloosterziel, D. Bartels, M. Koornneef et C.M. Karssen. 1993. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. A comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants. *Plant Physiol.* 102 : 1185-1191.

Ouellet, C.E. 1970. Climatic factors and plant winter survival. *Canada Agriculture.* 15 : 3-5.

Ouellet, C.E. 1977. Monthly climatic contribution to the winter injury of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 57 : 419-426.

Palta, J.W. et G. Simon. 1993. Breeding potential for improvement of freezing stress resistance : genetic separation of freezing tolerance, freezing avoidance, and capacity to cold acclimate. Dans : Li, P.H., et L. Christersson (ed.). *Advances in cold hardiness.* CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 299-310.

Paquin, R. 1977. Effets des basses températures sur la résistance au gel de la luzerne (*Medicago media* Pers.) et son contenu en proline libre. *Physiol. Vég.* 15 : 657-665.

Paquin, R. 1984. Influence of the environment on cold hardening and winter survival of forage plants and cereals; proline as a metabolic marker of hardening. Dans : Margaris, N.S., M. Arianoustov-Faraggitaki et W.C. Oechel (ed.). *Being alive on land.* Dr. W. Junk, Pub. Kluwer Academic Publishers Group, Boston, pp. 137-154.

- Paquin, R. 1985. Survie à l'hiver des plantes fourragères et des céréales sous les climats nordiques, en particulier au Québec: progrès et perspectives. *Phytoprotection* 66 : 105-139.
- Paquin, R. et P. Lechasseur. 1982. Acclimatation naturelle de la luzerne (*Medicago media* Pers.) au froid. II. Variations de la teneur en sucres totaux des feuilles et des collets. *Acta Oecol. Plant.* 3 : 27-38.
- Paquin, R. et G.R. Méhuys. 1980. Influence of soil moisture on cold tolerance of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 60 : 139-147.
- Paquin, R. et H. Pelletier. 1980. Influence de l'environnement sur l'acclimatation au froid de la luzerne (*Medicago sativa* Pers.) et sa résistance au gel. *Can. J. Plant Sci.* 60 : 1351-1366.
- Peltier, G.L. et H.M. Tysdal. 1932. A method for the determination of comparative hardiness in seedling alfalfa by controlled hardening and artificial freezing. *J. Agric. Res.* 44 : 429-444.
- Pesant, A.R., R. Bolduc et R. Drapeau. 1978. Effets de certains facteurs climatiques et édaphiques sur la survie à l'hiver de la luzerne au Québec. *Can. J. Plant Sci.* 58 : 449-458.
- Richard, C., Willemot, C., R. Michaud, M. Bernier-Cardou et C. Gagnon. 1982. Low-temperature interactions in Fusarium wilt and root rot of alfalfa. *Phytopathol.* 72 : 293-297.
- Roberts, D.W.A. 1984. Winterkill of fall-seeded winter wheat. Agriculture Canada Branch, Techn. Bull. 1984-10<sup>E</sup>. 13pp.
- Russell, W.E., F.J. Olsen et J.H. Jones. 1978. Frost heaving in alfalfa establishment on soils with different drainage characteristics. *Agron. J.* 70 : 869-872.
- Saravitz, D.M., D.M. Pharr et T.E. Carter. 1987. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol.* 83 : 185-189.

SAS Institute. 1990. SAS/Stat users guide. Version 6, 4<sup>th</sup> ed. SAS Inst., Cary, NC.

Sauter, J.J. et B. van Cleeve. 1991. Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar-conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation. J. Plant Physiol. 139 : 19-26.

Schwab, P.M., D.K. Barnes et C.C. Sheaffer. 1996. The relationship between field winter injury and fall growth score for 251 alfalfa cultivars. Crop Sci. 36 : 418-426.

Schwab, K.B. et U. Heber. 1984. Thylakoid membrane stability in drought-tolerant and drought- sensitive plants. Planta 161 : 37-45.

Smith, D. 1961. Association of fall growth habit and winter survival in alfalfa. Can. J. Plant Sci. 41 : 244-251.

Smith, R.R. et A.E. Krestschmer Jr. 1989. Breeding and genetics of legume persistence. Dans : Marten, G.C., A.G. Matches, R.F. Barnes, R.W. Brougham, R.R.J. Clement et G.W. Sheath (eds), Persistence of forage legumes. American Society of Agronomy, Madison, Wi, pp. 221-232.

Statistique Canada. 1997. Agricultural profile of Canada : Profil agricole du Canada, 1996. pp. 10.

Steel, R.G.D. et J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2<sup>nd</sup> eds. New York : McGraw et Hill. 633 pp.

Steffen, K.L., R. Arora et J.P. Palta. 1989. Relative sensitivity of photosynthesis and respiration to freezing-thaw stress in herbaceous species. Plant Physiol. 89 : 1372-1379.

- Steponkus, P.L. 1978. Cold hardiness and freezing injury of agronomic crops. *Adv. Agron.* 30 : 51-98.
- Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 : 543-584.
- Steponkus, P.L., M. Uemura et M.S. Webb. 1993. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat : two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. Dans : Steponkus, P.L. (Ed.), *Advances in low temperature biology*. JAI Press, Greenwich, Connecticut, USA, pp. 183-210.
- Suzuki, M. 1977. Effects of soil moisture on cold resistance of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 57 : 315.
- Suzuki, M., W.N. Black, J.A. Cutcliffe et J.D.E. Sterling. 1975. Frequency of occurrence of winter injury to forage legume, winter cereal and strawberry plants in Prince Edward Island. 1901-1975. *Can. J. Plant Sci.* 55 : 1085-1088.
- Suzuki, M. et C.B. Willis. 1974. Root lesion nematodes affect cold tolerance of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 54 : 585-586.
- Thomashow, M.F. 1990. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Genet.* 28 : 99-131.
- Twamley, B. E. 1960. Variety, fertilizer, management interactions in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 40 : 130-138.
- Tysdal, H.M. 1933. Influence of light, temperature, and soil moisture on the hardening process in alfalfa. *J. Agric. Res.* 46 : 483-515.

USDA. 1994. Agricultural statistics. National agricultural statistics service. United States Department of Agriculture. United States Government Printing Office Washington. pp. 204-210.

Volenc, J.J., P.J. Boyce et K.L. Hendershot. 1991. Carbohydrate metabolism in taproots of *Medicago sativa* during winter adaptation and spring regrowth. *Plant Physiol.* 96 : 786-793.

Waldman, M., A. Rkin, A. Dorrat et A.E. Richmond. 1975. Hormonal regulation of morphogenesis and cold-resistance. II. Effect of cold-acclimation and of exogenous abscisic acid on gibberellic acid and abscisic acid activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* 26 : 853-859.

Willemot, C. et L. Pelletier. 1979. Effect of drought on frost resistance and fatty acid content of young winter wheat plants. *Can. J. Plant Sci.* 59 : 639-643.

Wolfrain, L.A. et R.S. Dhindsa. 1993. Cloning and sequencing of the cDNA for *cas 17*, a cold acclimation - specific gene of alfalfa. *Plant Physiol.* 103 : 667-668.

Wolfrain, L.A., R. Langis, H. Tyson et R.S. Dhindsa. 1993. CDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation - specific gene, *cas 18*, of alfalfa (*Medicago sativa*) cells. *Plant Physiol.* 101 : 1275-1282.

## ANNEXES

**Annexe A.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives au regain après 3 semaines de repousse pour les plantes acclimatées en serre non chauffée (Chapitre 3, Figure 3)

Regain	Novembre	Décembre	Février	Mars
Carré Moyen	3.30 ns	0.15 ns	0.05 ns	0.79 ns
Moyenne	6.47	4.21	5.19	4.10
Écart - type	1.26	0.75	1.32	0.76
C.V. (%)	19.53	17.69	25.30	18.47

ns : non significatif au seuil 0.1

**Annexe B.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives au regain après 3 semaines de repousse pour les plantes endurcies en serre non chauffée et qui ont subi un test de congélation (Chapitre 3, Figure 5)

Regain	Octobre	Novembre ¶	Décembre ¶	Février	Mars ¶
Carré Moyen	4.95**	0.05**	0.02 ns	3.81**	0.09**
Moyenne	2.24	3.59	0.34	2.265	2.70
Écart - type	0.95	0.82	0.10	0.97	0.88
C.V. (%)	42.44	15.31	30.12	42.70	21.50

\*\* , ns : Différence significative au seuil 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

¶ Données ayant subi la transformation logarithmique

**Annexe C.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives au regain (g de poids sec) lors de chaque échantillonnage pour les plantes endurcies en serre non chauffée et qui ont subi un test de congélation (Chapitre 3, Figure 6)

### Octobre

Température (°C)	Carré Moyen	Moyenne (g P.S.)	Écart - type	C.V. (%)
3	5.31**	5.49	0.87	15.77
5	5.09*	2.42	1.36	56.16
7	0.01 ns	1.04	1.01	97.35
9	0.01 ns	0.02	0.09	424.26

\*, \*\*, ns : Différence significative respectivement au seuil 0.1 et 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

### Novembre

Température (°C)	Carré Moyen	Moyenne (g P.S.)	Écart - type	C.V. (%)
10	1.53**	6.17	0.63	10.17
12	0.29 ns	5.71	0.96	16.76
14	0.93 ns	3.54	0.95	26.68
16	1.11 ns	1.90	0.73	38.49
18	0.89*	0.987	0.567	57.49
20	0.34**	0.3327	0.30	89.45

\*, \*\*, ns : Différence significative respectivement au seuil 0.1 et 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

### Décembre

Température (°C)	Carré Moyen	Moyenne (g P.S.)	Écart - type	C.V. (%)
12 ¶	0.0001 ns	2.76	0.62	12.20
14	0.05 ns	2.31	0.64	27.67
16	0.43 ns	1.06	0.79	74.53
18	0.41 ns	0.64	0.54	84.04
20	0.06 ns	0.22	0.25	115.36
22 ¶	0.02 ns	0.09	0.23	228.77

ns : Différence non significatif au seuil 0.1.

¶ Données ayant subi la transformation logarithmique

**Février**

Température (°C)	Carré Moyen	Moyenne (g P.S.)	Écart - type	C.V. (%)
14 ¶	0.002 ns	5.24	1.11	9.81
16	4.89 ns	3.20	1.44	44.91
18	3.09 **	1.694	0.82	48.31
20	0.85 ns	0.73	0.85	116.64
22 ¶	0.02 ns	0.19	0.33	153.98
24	0.18 ns	0.10	0.42	424.26

\*\* , ns : Différence significative au seuil 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

¶ Données ayant subi la transformation logarithmique

**Mars**

Température (°C)	Carré Moyen	Moyenne (g P.S.)	Écart - type	C.V. (%)
10	8.21**	4.08	1.04	25.43
12	0.06 ns	3.95	1.11	28.10
14	0.35 ns	3.50	1.21	34.56
16	1.58 ns	2.41	0.79	32.83
18	0.48 ns	0.80	0.51	63.86
20 ¶	0.02 ns	0.30	0.42	102.16

\*\* , ns : Différence significative au seuil 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

¶ Données ayant subi la transformation logarithmique

**Annexe D.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives à l'accumulation des sucres dans les collets des plantes acclimatées en serre non chauffée. (Chapitre 3, Figures 7,8,9)

Date	Stachyose	Raffinose	Saccharose	Glucose	Fructose	Amidon
Octobre		0.04 ns	804.81**	10.44 ns	0.01 ns	1743.58 ns
Novembre	0.51 ns	0.25 ns	368.14*	0.26 ns	1.94 ns	991.58 ns
Décembre	0.90 ns	9.92 *	162.33ns	1.60 ns	1.03 ns	1812.33 ns
Février	23.43**	78.68** ¶	2292.70*	6.62 ns	0.89 ns	743.25 ns
Mars	4.66 ns	2.16 ns	271.27 ns	0.06 ns	0.03ns	698.25 ns

\*, \*\*, ns : Différence significative respectivement au seuil 0.1 et 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

¶ Données ayant subi la transformation logarithmique

Date		Stachyose	Raffinose	Saccharose	Glucose	Fructose	Amidon
Octobre	Moyenne		0.075	41.62	3.96	0.11	150.08
	Écart - type		0.23	12.55	1.98	0.18	43.19
	C.V. (%)		300.75	32.56	50.07	160.86	28.78
Novembre	Moyenne	1.22	4.47	154.62	9.87	3.12	113.42
	Écart - type	0.76	0.62	10.75	1.37	1.09	47.14
	C.V. (%)	62.39	13.80	6.95	13.85	35.20	41.56
Décembre	Moyenne	7.85	10.55	142.95	9.67	2.68	111.17
	Écart - type	1.32	1.81	20.99	1.40	1.01	41.47
	C.V. (%)	16.78	17.12	14.68	14.52	37.65	37.31
Février	Moyenne	14.42	18.63	149.80	10.69	2.29	44.25
	Écart - type	2.09	3.82	24.51	3.32	0.83	19.25
	C.V. (%)	14.52	20.51	16.36	31.01	36.42	43.49
Mars	Moyenne	13.11	15.98	140.91	12.13	1.81	43.00
	Écart - type	1.55	2.38	42.78	1.34	0.98	29.09
	C.V. (%)	11.82	14.91	30.36	11.06	54.19	67.65

**Annexe E.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives à l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* dans les collets des plantes acclimatées en serres non chauffée (Chapitre 3, Figure 10)

Date	Gène <i>msaCIA</i>	Gène <i>msaCIC</i>
Octobre	11318*	6.35 ns
Novembre	237793 ns	3764 ns
Décembre	24876 ns	5122 ns
Février	2298788 ns	16740 ns
Mars	719165 ns	1547 ns

\*, ns : Différence significative au seuil 0.1 et non significatif au seuil 0.1.

Date		Gène <i>msaCIA</i>	Gène <i>msaCIC</i>
Octobre	Moyenne	696.97	50.17
	Écart - type	61.18	7.36
	C.V.(%)	8.78	14.66
Novembre	Moyenne	3387.33	451.18
	Écart - type	490.22	69.54
	C.V.(%)	14.47	15.41
Décembre	Moyenne	3279.83	250.23
	Écart - type	540.79	55.70
	C.V.(%)	16.49	22.26
Février	Moyenne	3746.73	248.88
	Écart - type	1487.69	123.06
	C.V.(%)	39.71	49.45
Mars	Moyenne	2393.88	131.01
	Écart - type	654.58	59.91
	C.V.(%)	27.34	45.73

**Annexe F.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives à l'accumulation des sucres dans les feuilles et les collets des plantes acclimatées en conditions contrôlées. (Chapitre 3, Figures 11, 15)

Site de prélèvement	Stachyose	Raffinose	Saccharose	Glucose	Fructose	Amidon
Feuilles		0.85 ns	247.28 ns	134.95 ns	77.82 ns	
Collets	0.10 ns	0.19 ns	882.76 ns	0.52 ns	0.01 ns	1872.00ns

ns : Différence non significatif au seuil 0.1.

Site de prélèvement		Stachyose	Raffinose	Saccharose	Glucose	Fructose	Amidon
Feuilles	Moyenne		4.24	21.74	24.65	21.31	
	Écart - type		2.12	12.05	9.87	8.17	
	C.V. (%)		49.89	55.42	40.02	38.34	
Collets	Moyenne	2.16	4.32	115.70	5.43	0.09	155.14
	Écart - type	0.45	0.64	19.55	1.58	0.19	39.26
	C.V. (%)	20.68	14.90	16.90	29.18	225.16	25.31

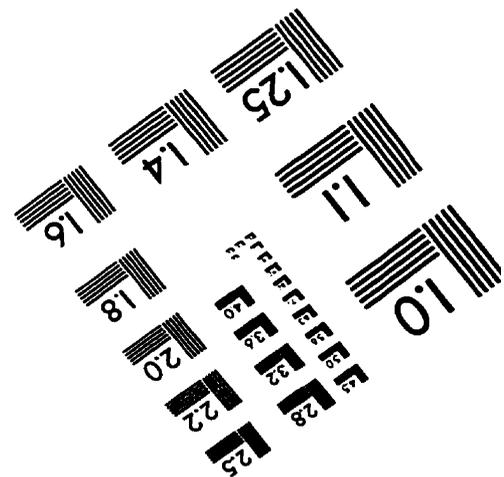
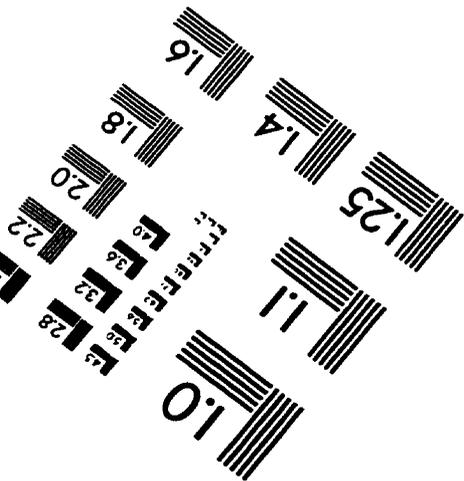
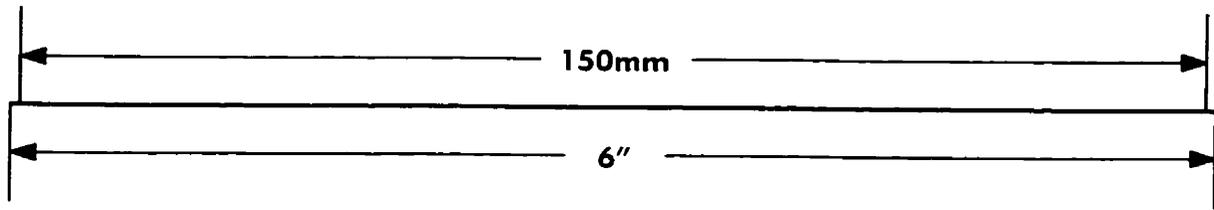
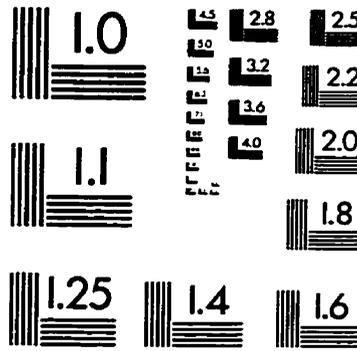
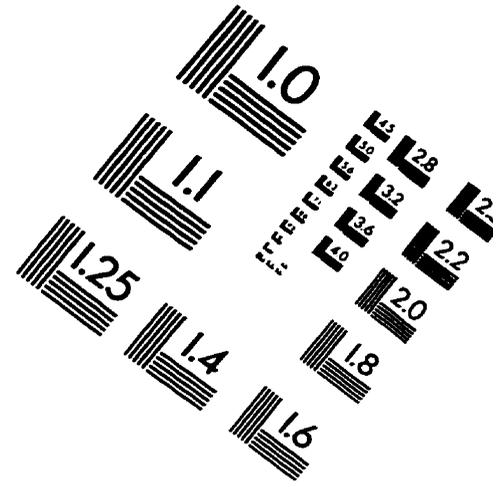
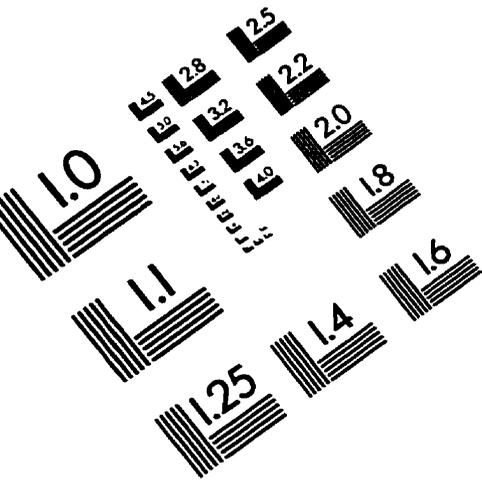
**Annexe G.** Analyse de la variance (carrés moyens) des données relatives à l'expression des gènes *msaCIA* et *msaCIC* dans les feuilles et les collets des plantes acclimatées en conditions contrôlées (Chapitre 3, Figure 13, 16)

Site de prélèvement	Gène <i>msaCIA</i>	Gène <i>msaCIC</i>
Feuilles	752594 ns	1063 ns
Collets	1720456**	30795 ns

\*\* , ns : Différence significative au seuil 0.05 et non significatif au seuil 0.1.

Site de prélèvement		Gène <i>msaCIA</i>	Gène <i>msaCIC</i>
Feuilles	Moyenne	1917.2	58.2
	Écart - type	1185.4	32.2
	C.V. (%)	61.8	55.3
Collets	Moyenne	2731.0	1864.3
	Écart - type	589.2	608.9
	C.V. (%)	21.6	32.7

# IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc  
1653 East Main Street  
Rochester, NY 14609 USA  
Phone: 716/482-0300  
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved