THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »
Secteur de Recherche : Biologie des organismes.

Présentée par :
Wagdi GHALEB

****

Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Lolium perenne* L., *Festuca arundinacea* Schreb et *Dactylis glomerata* L.

****

Directeur de Thèse :

Abraham ESCOBAR-GUTIÉRREZ

****

Soutenue le 11 Juillet 2019

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Rossitza ATANASSOVA	Professeur, Université de Poitiers	Examinateur
Marie-Pascale PRUD'HOMME	Professeur, Université de Caen-Basse Normandie	Rapporteur
Béatrice TEULAT	Maître de conférences, Agrocampus Ouest	Rapporteur
Florence VOLAIRE	Chargé de Recherche, INRA, Montpellier	Examinateur
Abraham ESCOBAR-GUTIÉRREZ	Directeur de Recherche, INRA, Lusignan	Examinateur

REMERCIEMENTS

Ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont travaillé avec moi et qui m'ont apporté leur soutien ne peut pas être résumée en quelques lignes : j'espère que vous réalisez déjà tous le respect que j'ai pour vous et à quel point j'ai apprécié ces années à vos côtés !

Je remercie tout d'abord Abraham Escobar-Gutiérrez pour m'avoir proposé cette thèse, encadré et soutenu durant ces trois années. Ta confiance m'a permis de prendre conscience de mes compétences et de mes capacités. Merci !

Je tiens à remercier Marie-Pascale PRUD'HOMME et Béatrice TEULAT d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Rossitza ATANASSOVA et Florence VOLAIRE pour leur rôle d'examinateur.

Je souhaite remercier chaleureusement l'ensemble des membres de l'équipe d'Écophysiologie pour leur accueil et la bonne humeur quotidienne qui règne au sein de l'équipe qui m'ont permis de m'épanouir humainement, professionnellement et intellectuellement.

Merci à celles et ceux qui ont participé à l'acquisition des données sur lesquelles repose cette thèse, non seulement pour leur expertise et leur travail impeccable, mais aussi pour leur contribution à ma formation et pour leur convivialité : Annie Eprinchard, Erick Rivault, Wendy Olivares-Rodriguez, Eric Roy, Cédric Perrot, Jean-Pierre Terrasson, Arnaud Philiponneau, Rémi Dupuis, Aurélia Boutet.

J'adresse également mes sincères remerciements à Jean-Louis Durand, Didier Combes, Ela Frak et Romain Barillot pour leur soutien dans les moments difficiles.

Un très grand merci pour Philippe BARRE avec qui j'ai travaillé sur l'une des expérimentations. Je vous remercie pour votre contribution à la rédaction d'un chapitre intégré dans ce manuscrit et pour les conseils pertinents et les discussions enrichissantes qui ont fait avancer les travaux.

Je remercie Isabelle Boissou et Nathalie Bonnet pour leur énergie et leur optimisme face aux problèmes administratifs rencontrés durant mon doctorat. Ce soutien m'a permis de me concentrer uniquement sur l'aspect scientifique.

Un grand merci au Centre libyen de recherche en biotechnologie, au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique libyen, et à l'ambassade libyenne en France pour leur confiance et leur soutien financier qui m'ont permis d'arriver au terme de ce travail de thèse dans des conditions idéales.

Merci à ma famille : ma mère, mon père, mes sœurs et frères pour leurs encouragements et soutien sans faille. Je tiens à vous exprimer ici ma reconnaissance et ma gratitude.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mon épouse et mes enfants pour leur soutien inflexible et tous les moments de joie qu'ils m'apportent. Votre soutien moral a été la clé de la réussite de cette thèse.

SOMMAIRE

Chapitre I : introduction générale 9
1. INTRODUCTION 11
2. ETAT DE L'ART 13
2.1. Le contexte des prairies 13
2.1.1 La productivité des prairies 15
2.2. Morphologie et anatomie du ray-grass anglais 18
2.3. Morphologie et anatomie de la fétuque élevée 20
2.4. Germination et Environnement 22
2.4.1. La germination 22
2.4.2. La dormance 23
2.4.3. La viabilité des graines 26
2.4.4. Contrôle environnemental de la germination 27
2.4.5. Impacts du changement climatique sur la germination 29
3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 31
4. MATÉRIEL ET MÉTHODE GÉNÉRAL 32
4.1. Matériel végétal 32
4.2. Test de germination 32
Chapitre II: Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température 34
1. INTRODUCTION 35
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES 36
2.1. Matériel végétal et test de germination 36
2.2. Analyses des données 36
2.3. Pourcentages de germination 36
2.4. Vitesse de germination 36
2.5. Analyses multivariées 37
3. RÉSULTATS 39
3.1. Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Lolium perenne* L. 39
3.1.1. Effets de la température sur le pourcentage de germination maximal 39
3.1.2. Effets de la température sur la vitesse de germination 48
3.2. Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Festuca arundinacea* Schreb L. 60
3.2.1 Effets de la température sur le pourcentage de germination maximal 60
3.2.2 Effets de la température sur la vitesse de germination 70

3.3. Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Dactylis glomerata* L. 82
3.3.1. Effets de la température sur le pourcentage de germination maximal 82
3.3.2. Effets de la température sur la vitesse de germination 85
3.4. Analyse de la diversité génétique de la germination en réponse à la température de *Triticum aestivum* L. et *Hordeum vulgare* L. 95
4. DISCUSSION 97
Chapitre III : Effet de la conservation des lots de graines sur leur réponse germinative à la température 101
1. INTRODUCTION 103
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES 104
2.1. Matériel végétale et Test de germination 104
2.2. Ajustement des courbes et analyses statistiques 104
2.2.1. Normalité des résidus 104
2.2.2. Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S test): 104
2.2.3. Test de Nash-Sutcliffe efficiency (NSE): 105
3. RÉSULTATS 106
3.1. Effets du temps de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température 106
3.2. Effets du lieu de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température 114
4. DISCUSSION 120
Chapitre IV : Origine génétique de la capacité germinative à différentes températures ? 125
1. INTRODUCTION 127
2. Sélection divergente pour la capacité à germer à différentes températures chez le ray-grass anglais: 129
2.1. Modèle expérimental et système d'étude 129
2.2. Analyses statistiques 131
2.3. RESULTATS 133
2.4. DISCUSSION 135
3. Bulk Segragant Analysis (BSA) 137
3.1 Matériels et méthodes 137
3.3.1. Matériel végétal et extraction d'ADN 137
3.3.2. Préparation de banques GBS (Genotyping by Sequencing): 138
3.3.3. Analyse bio-informatique 139
3.3.4. Analyse statistique 139
3.2 RESULTATS 140

3.3 DISCUSSION 142
Chapitre V : It takes long to germinate seeds of cool-season grasses at low temperature 145
1. ABSTRACT 148
2. INTRODUCTION 149
3. MATERIALS AND METHODS 152
3.1. Seed Material 152
3.2. Germination Experiment 152
3.3. Analysis of Germination data 153
4. RESULTS 157
4.1. Effects of temperature on germination time and germination rate 157
4.2. Effects of temperature on final germination percentage 158
4.3. Typologies of germination responses to temperature 158
4.4. Potential artefacts in measuring germinability 164
5. DISCUSSION 165
6. CONCLUSION 166
Conclusion et perspectives 169
Références bibliographiques 173
Annexes 191

Chapitre I :

Introduction générale

1. INTRODUCTION

Les prairies sont des peuplements végétaux mono ou plurispécifiques, principalement composées de graminées et de légumineuses pérennes mais aussi d'autres espèces de dicotylédones et parfois d'arbustes. Elles sont généralement destinées à l'alimentation des ruminants et sont fauchées et/ou pâturées. Deux types de prairies sont distingués : les prairies permanentes «prairies naturelles ou semées depuis plus de six ans» et les prairies temporaires «prairies semées incluses dans un système de rotation de cultures, d'une durée comprise entre une et cinq années». En 2007, les prairies permanentes et temporaires recouvrent encore 31% et 5% respectivement, de la Surface Agricole Utile (SAU) des pays de l'Union Européenne à 27 (UE-27) (Vliegher *et al.*, 2014). En plus de la production de fourrage, le caractère plurispécifique et la pérennité des prairies en font un agrosystème ayant des impacts positifs sur l'environnement, contrairement aux cultures annuelles. En effet, les prairies contribuent à maintenir la biodiversité, à favoriser la séquestration du carbone dans le sol, à la fertilité des sols, à diminuer l'érosion des sols et à protéger la qualité de l'eau.

La productivité des prairies, est influencée par les conditions climatiques, telles que (i) la concentration de CO_2 de l'air, (ii) la température moyenne, (iii) la distribution annuelle des précipitations et (iv) la demande évapo-transpirative (Lal, 2004; Soussana et Lüscher, 2007). La productivité est influencée aussi par les caractéristiques du sol, le mode d'exploitation (principalement l'intensité et fréquence de coupe ou de pâturage et les apports fertilisants) et la composition botanique des prairies.

En effet, la productivité des prairies dépend de la structure physique et de la structure génétique du couvert. La structure génétique des prairies évolue au fil des saisons en raison des facteurs biotiques et abiotiques qui causent la mortalité de certains individus et le recrutement de nouveaux, par sur-semis naturel ou artificiel et germination de la banque de graines du sol.

Par conséquent, les facteurs de l'environnement qui affectent la germination, peuvent indirectement aussi contribuer à modifier la structure génétique et physique d'une prairie.

La germination a fait l'objet de nombreuses études agronomiques, physiologiques et biochimiques (Escobar-Gutiérrez et al., 1998). Elle est influencée par des facteurs environnementaux et le patrimoine génétique de la graine (Koornneef et al., 2002; Shafii et

Price, 2001). La température est l'un des facteur les plus importants, car elle régule la germination de trois façons: en déterminant la capacité germinative et la vitesse de germination, en levant la dormance primaire et/ou secondaire, et en induisant la dormance secondaire (Bewley et Black, 1994).

Dans une étude précédente, sur un petit nombre d'accessions de trois espèces de graminées pérennes (Ahmed, 2015), il a été mis en évidence que de la diversité génétique existe chez le *Lolium perenne* L.*,* la *Festuca arundinacea* Schreb et le *Dactylis glomerata* L, en réponse aux températures pendant la germination.

Cette thèse a été réalisée en poursuivant deux objectifs.

- ✓ L'objectif majeur de ce travail est d'analyser la diversité génétique de la réponse germinative à la température chez des populations de trois espèces de graminées fourragères pérennes : ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.), dactyle (*Dactylis glomerata* L.).

- ✓ L'objectif secondaire est d'analyser la diversité génétique de la réponse germinative à la température chez deux espèces domestiquées de graminées annuelles, le blé (*Triticum aestivum* L.) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.), afin de comparer ces réponses avec celles de nos graminées fourragères pérennes.

2. ETAT DE L'ART

2.1. Le contexte des prairies

Les prairies sont l'un des types de végétation les plus répandus dans le monde et les plus grands écosystèmes, avec une superficie estimée à 40,5 % de la surface émergée de la terre. Dans les régions tempérées, les prairies sont des communautés végétales multi-espèces dominées par des espèces de graminées (Green, 1990). En agronomie, la prairie est définie comme une « surface dont les peuplements végétaux sont composés principalement de poacées et de légumineuses fourragères, utilisées pour l'alimentation des polygastriques » (Larousse Agricole, 2003).

Deux types de prairies sont distingués : les prairies permanentes (prairies naturelles ou semées depuis plus de six ans) et les prairies temporaires (prairies semées incluses dans un système de rotation de cultures, d'une durée comprise entre une et cinq années de campagne).

Depuis les cent dernières années, les pratiques agricoles ont radicalement changé et une grande superficie de prairies permanentes a été labourée. En effet, la superficie des prairies européennes a diminué au cours des 30 dernières années en faveur de la production de cultures annuelles (Alex et al., 2010). De plus, les prairies sont gérées de façon plus intensive, ce qui entraîne une diminution de la diversité d'espèces (Green, 1990).

Les prairies permanentes et temporaires représentaient en 2007 environ 33 % et 6 %, respectivement, de la superficie agricole utilisée (SAU) européenne. Cette proportion n'est pas la même dans tous ces pays (**Figure 1.1**). Par exemple, les prairies temporaires occupaient 2,5 million d'hectares, soit environ 10% de la SAU française (Agrestr, 2010). De plus, il y a de grandes différences régionales dans la productivité des prairies en Europe ce qui est présentée à la **Figure 1.2** (Smit et al., 2008).

En plus de ses fonctions de production, les prairies ont des impacts positifs sur l'environnement. En effet, elles ont un bon potentiel de séquestration du carbone dans le sol, protègent le sol contre l'érosion éolienne et hydrique, améliorent la fertilité du sol et contribuent à l'amélioration de la qualité de l'eau infiltré vers les aquifères (Peeters, 2009; Vliegher et al., 2014). En plus, les prairies contribuent à maintenir la biodiversité et sont une composante importante du paysage.

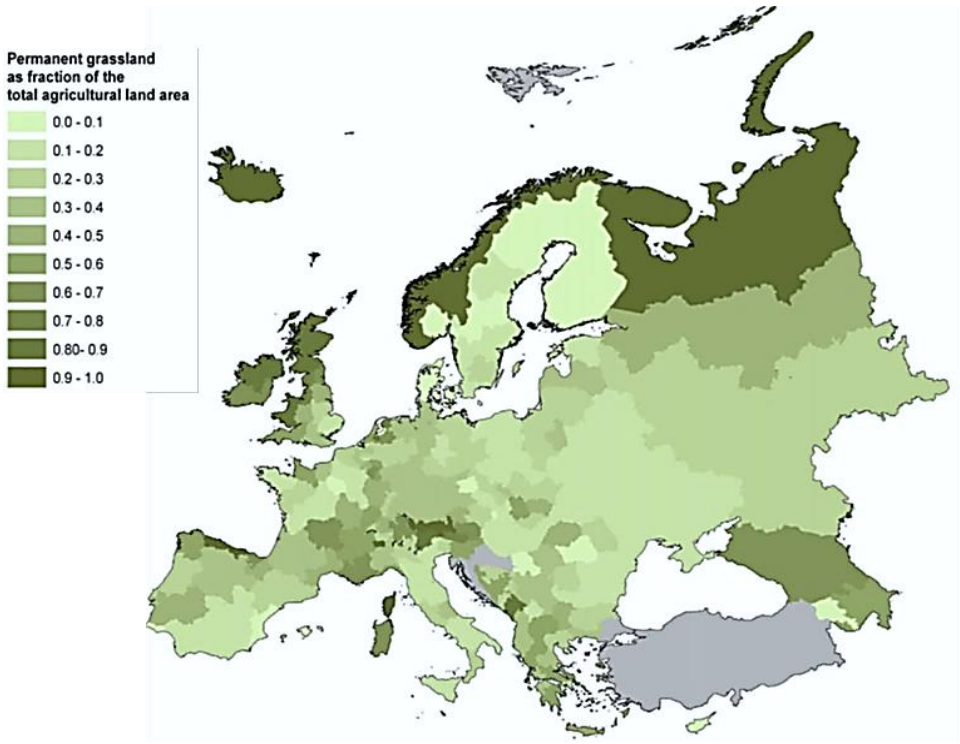


Figure1.1: Distribution spatiale des prairies permanentes en pourcentage des terres agricoles utilisées (moyenne de 1995-2004) en Europe (Smit et al., 2008).

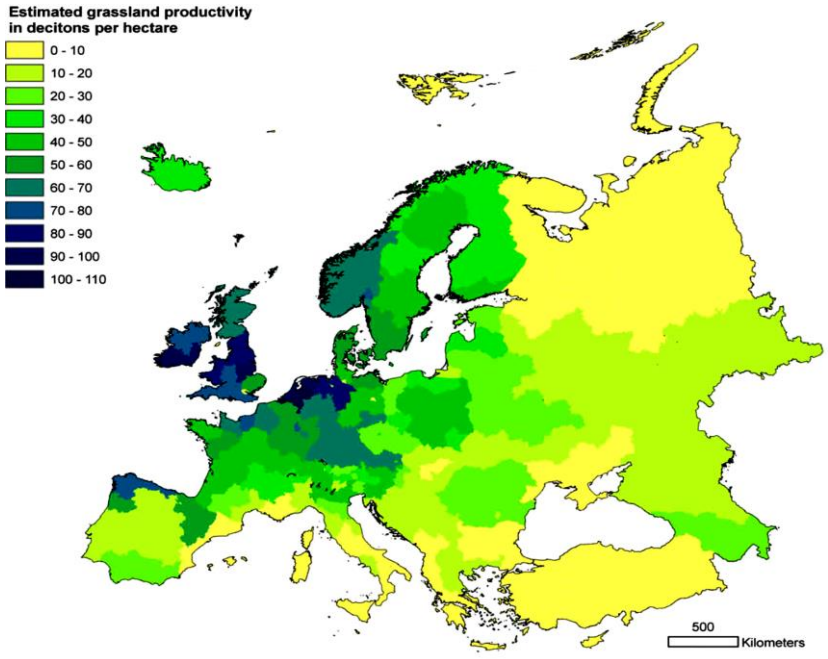


Figure 1.2: Distribution spatiale de la productivité des prairies (tons de matière sèche ha^{-1}) en Europe. (Smit et al., 2008).

2.1.1 La productivité des prairies

La productivité des prairies, est d'abord influencée par les conditions climatiques, tel que (i) la température moyenne, (ii) la distribution annuelle des précipitations, (iii) la concentration en CO_2 de l'air et (iv) la demande d'évapotranspiration (Smit et al., 2008; Lal, 2004; Soussana et Lüscher, 2007). Il y a une différence dans la distribution de la production au cours de l'année (**Figure 1.3**).

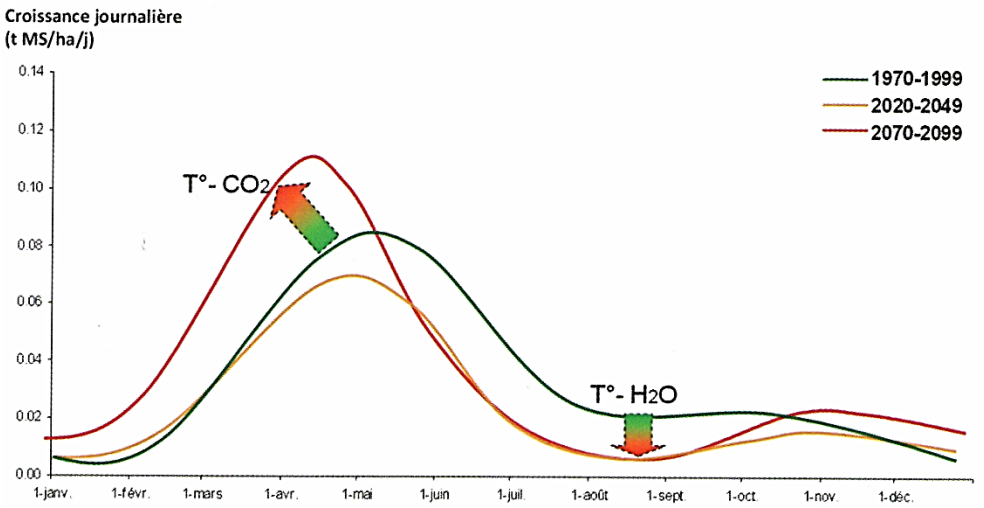


Figure 1.3: Evolution annuelle de la production journalière de fétuque au cours de l'année (Durand et al., 2010).

En effet, des études indiquent une accélération de la production en hiver et au printemps suivant, jusqu'à utilisation complète de l'eau disponible dans la réserve du sol. En été, il y a diminution dans la productivité quotidienne, à cause du stress hydrique, qui se prolonge à l'automne. Ainsi, le changement climatique devrait amplifier l'écart entre la surproduction d'herbe au printemps et le manque de fourrages en été (Durand et al., 2010).

La structure du couvert végétal est un facteur central dans l'établissement de la valeur d'usage agricole des prairies (dynamique temporale de la quantité et qualité de la biomasse récoltée). La structure du couvert ne joue pas juste un rôle dans la production de biomasse mais également sur la disponibilité de cette biomasse au prélèvement réalisé soit par l'homme lors de fauchage, soit par l'animal lors du pâturage. La structure du couvert résulte d'un système complexe de déploiement des architectures individuelles dans un contexte d'interactions entre plantes lié aux compétitions pour les ressources du milieu (**Figure 1.4**).

La productivité de la prairie est influencée par les caractéristiques du sol, le mode d'exploitation (principalement la fréquence de coupe ou de pâturage et les apports de fertilisants) et la composition botanique de la prairie.

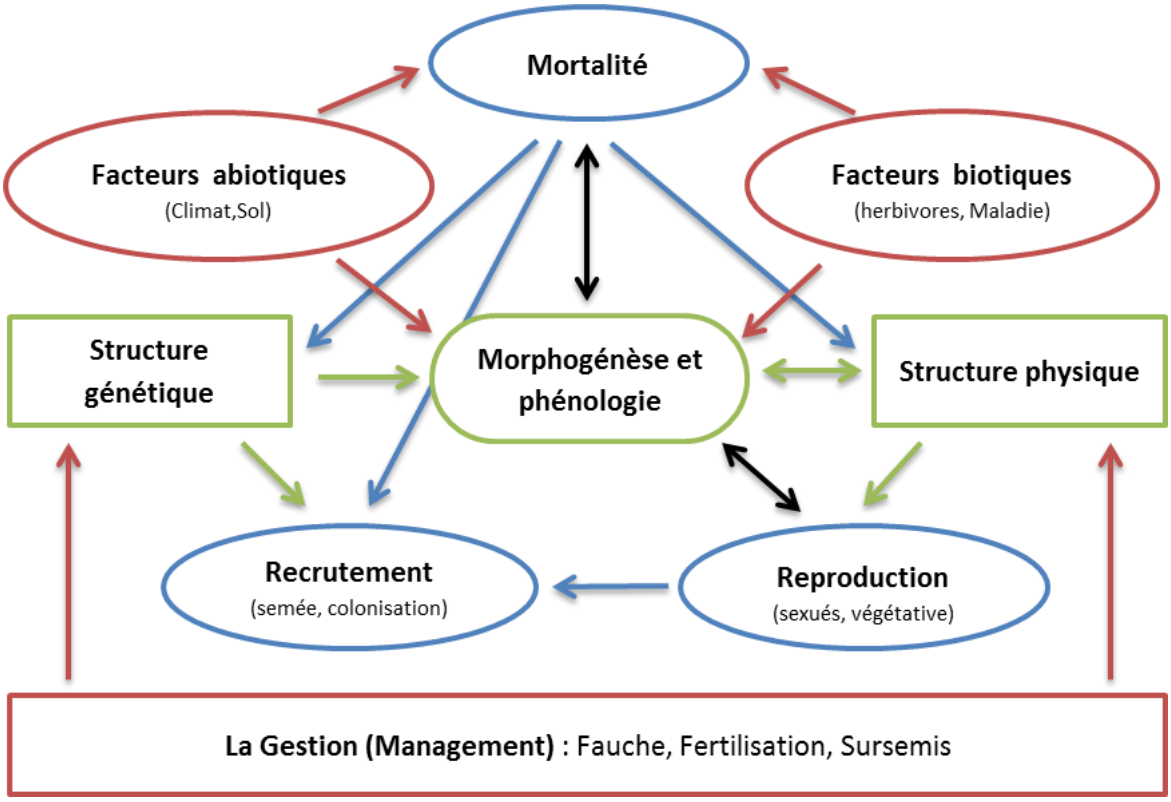


Figure 1.4. Schéma relationnel du fonctionnement d'agrosystème prairie.

2.1.1.1. La structure génétique

La structure génétique des prairies évolue au fil des saisons en raison des facteurs abiotiques et biotiques qui causent la mortalité de certains individus et le recrutent d'autres nouveaux, soit par semis naturel, soit par germination des graines de la banque de graines du sol. La structure génétique affecte la phénologie et la morphogenèse des prairies (Verdenal et al., 2012) (**Figure 1.4**).

L'environnement fonctionne comme un filtre (ou tamis) en levant tous les individus qui ne possèdent pas de combinaisons spécifiques de traits et déterminent ainsi le pool d'espèces susceptibles de se maintenir dans une zone géographique plus ou moins large (**Figure 1.5**) (Keddy, 1992).

Les changements de la structure génétique peuvent affecter la productivité primaire. L'augmentation expérimentale de la richesse en espèces augmente souvent la productivité primaire à court terme (Hector et al., 1999; Naeem et al., 1994; Tilman et al., 1996). La

diversité spécifique et génétique pourrait jouer des rôles bénéfiques et complémentaires pour l'optimisation de la production de fourrage dans les prairies semées (Litrico et al., 2015).

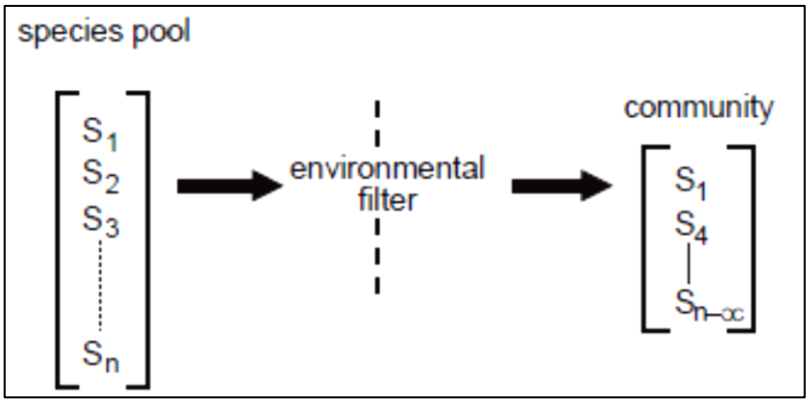


Figure 1.5: Effet de l'environnement sur la composition génétique des prairies (Keddy, 1992).

2.1.1.2. La structure physique

La structure physique du couvert végétal, c'est-à-dire la distribution spatiale des phytoéléments des plantes, résulte des interactions entre la morphogenèse des plantes individuelles (Combes et al., 2015). La capacité à capter les ressources lumineuses et à absorber les ressources disponibles dans le sol dépend de la structure physique de la plante. C'est donc la structure physique des prairies qui joue un rôle clé dans la production primaire de biomasse.

2.2. Morphologie et anatomie du ray-grass anglais

Le ray-grass anglais (*Lolium perenne L.*) est une espèce cespiteuse pérenne originaire d'Europe, d'Asie tempérée et d'Afrique du Nord (Blanco-Pastor et al., 2019; Peeters, 2004) Il est largement répandu dans le monde, incluant Amérique du Nord et du Sud, en Europe, en Nouvelle-Zélande et en Australie (Hannaway et al., 1999 ; Peeters, 2004 ; Dafwa, 2006). En Europe, il est le plus répandu dans l'utilisation des terres agricoles, couvrant 45% de la superficie totale (Eurostat, 2017). La plupart de ces prairies sont des prairies naturelles ou semi-naturelles permanentes. Le ray-grass anglais est l'espèce fourragère la plus importante semée dans les systèmes agricoles tempérés où il est exploité par le pâturage et le fauchage. Sa valeur économique repose sur une alimentation de haute qualité avec une très bonne digestibilité. En effet, le ray-grass montre la qualité et la quantité la plus élevées de la biomasse récoltée (Smith et al., 2001 ; Baert et Van Waes, 2014).

L. perenne est aussi largement utilisé comme gazon sur les terrains de sport dans les climats tempérés, en raison de sa croissance rapide (Christians, 2004). Il est utilisé en mélanges avec d'autres espèces telles que *Festuca rubra* et *Poa pratensis* L. (Beard, 1973).

Les agronomes ont amélioré le rendement des plantes et aussi la résistance aux maladies (Barre et al., 2006). Les activités de sélection du ray-grass sont importantes en Europe où elles visent à développer des génotypes présentant une résistance accrue à la sécheresse et au gel (Huyghe et al., 2014). Cependant, des lignées pures ou des variétés hybrides n'ont pas été développées parce que *L. perenne* est une espèce allogame, hautement auto-incompatible. Une autre conséquence de son système de reproduction est que les écotypes présentent donc généralement des niveaux élevés de variabilité génétique (Thorogood, 2003 ; Blanco-Pastor et al., 2019). La morphologie du ray-grass anglais est présentée dans la **Figure 1.6**.

Le ray-grass anglais est le mieux adapté aux climats océaniques, tempérés et humides où il pousse plus de 8 mois par an. La quantité minimale de précipitations nécessaire est de 457-635 mm par an. La température pour sa croissance maximale se situe entre 20 et 25˚C. La profondeur de semis doit être de 10 mm. *L. perenne* est plus tolérant aux sols acides et alcalins, mais il pousse mieux à un pH > 4. Il est indifférent à la texture du sol, mais les limons et les argiles sont le type de sol le plus approprié (Hannaway et al., 1999 ; Peeters, 2004 ; Dafwa, 2006).

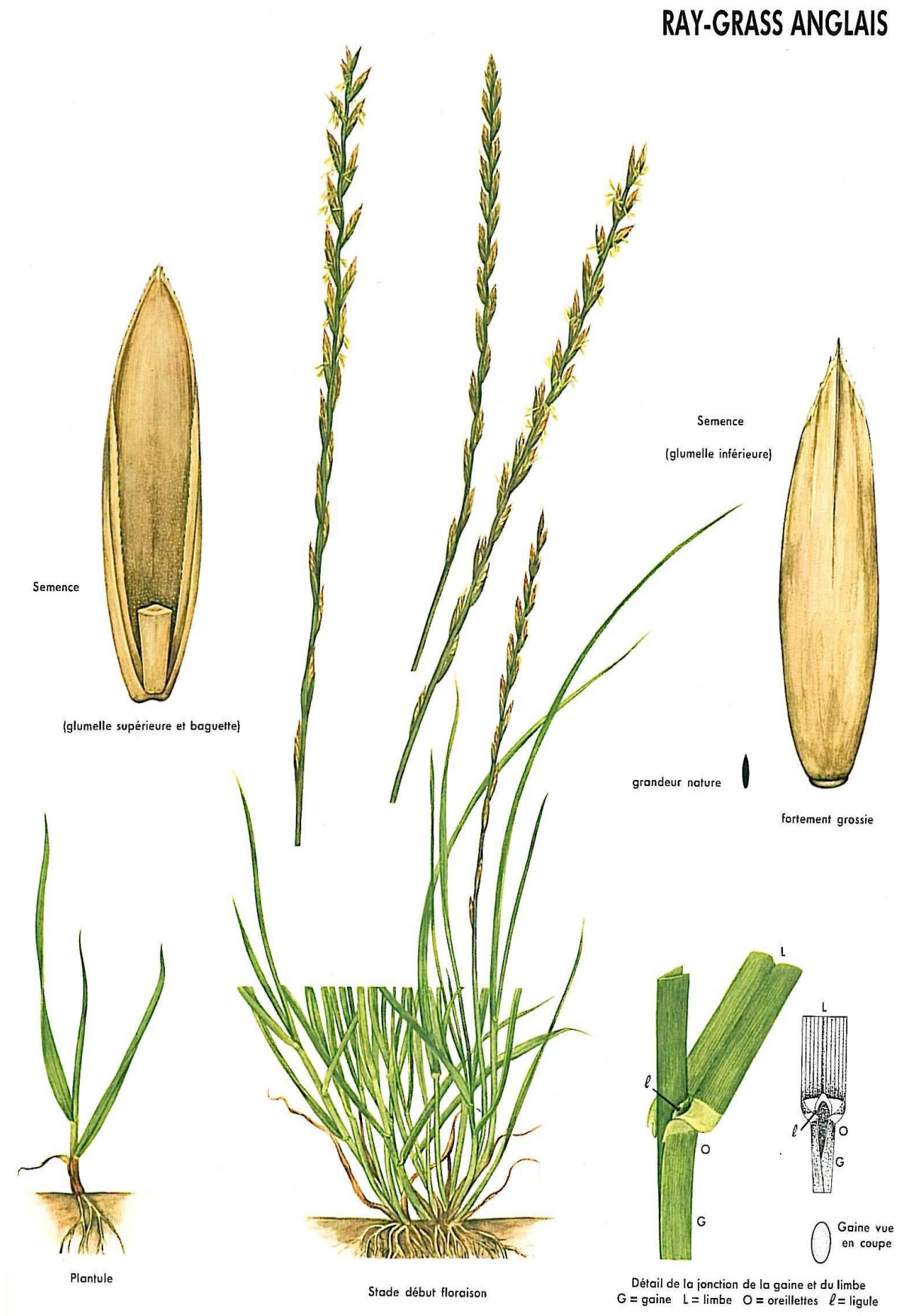


Figure 1.6 : Morphologie du *Lolium perenne L*. (Fiche Acta, 410 de l'Association de Coordination Technique Agricole; 1987).

2.3. Morphologie et anatomie de la fétuque élevée

La fétuque élevée (*Festuca arundinacea Schreb*.) est une graminée pérenne, originaire d'Europe occidentale et d'Afrique du Nord. Elle a été introduite d'Europe en Amérique du Nord et du Sud (Jong J u, 2003 ; Peeters, 2004). Dans la famille des Poaceae, le genre *Festuca* est l'un des plus grands avec plus de 500 espèces (Hand et al., 2012). La fétuque élevée, l'espèce la plus importante du genre sur le plan agricole, est un complexe de sous-espèces dont les niveaux de ploïdie varient. Malgré tout, le type le plus courant est l'allohexaploïde allogame avec 2n = 6x = 42 (Hand et al., 2012). *F. arundinacea* peut être hybridé avec du ray-grass annuel ou pérenne pour le développement du festulolium (Yamada et al., 2005). Elle est largement utilisée comme foin, pâturage et pour la conservation des sols dans les climats tempérés et méditerranéens.

Dans les régions tempérées, la fétuque élevée est de plus en plus utilisée comme espèce de gazon en raison de sa résistance à la chaleur et à la sécheresse comparativement à d'autres plantes pérennes comme *L. perenne* et *Poa pratensis* L. (Sleper et West, 1996; Peeters, 2004). Cependant, les variétés méditerranéennes sont sensibles aux basses températures (Peeters, 2004). D'autre part, ses bonnes résistances aux extrêmes de chaleur et de sécheresse pourraient être dues à son environnement plus dense dans les couches profondes du sol que les autres graminées (Bonos et al., 2004; Deru et al., 2012). La fétuque élevée peut être utilisée avec souplesse dans divers systèmes d'élevage; elle peut être cultivée en association avec des légumineuses (*Trifolium repens et T. pratense*) ou avec d'autres graminées pour la production de foin ou de fourrage (Sleper et West, 1996). La morphologie de la fétuque élevée est décrite à la **Figure 1.7**.

La fétuque élevée pousse principalement dans une zone de précipitations minimales de 450 à 500 mm annuels. La saison de croissance s'étend sur plus de 7 mois par an dans les climats tempérés et 6 mois dans les conditions méditerranéennes.

La fétuque élevée est tolérante aux sols acides et alcalins. Cependant, elle pousse mieux à un pH compris entre 6,5 et 8. Elle est indifférente à la texture du sol. On la trouve souvent sur des sols argileux lourds ou sur un terreau profond. La fétuque élevée est semée à des profondeurs de 10 mm (Hannaway et al., 1999 ; Peeters, 2004 ; Dafwa, 2006).

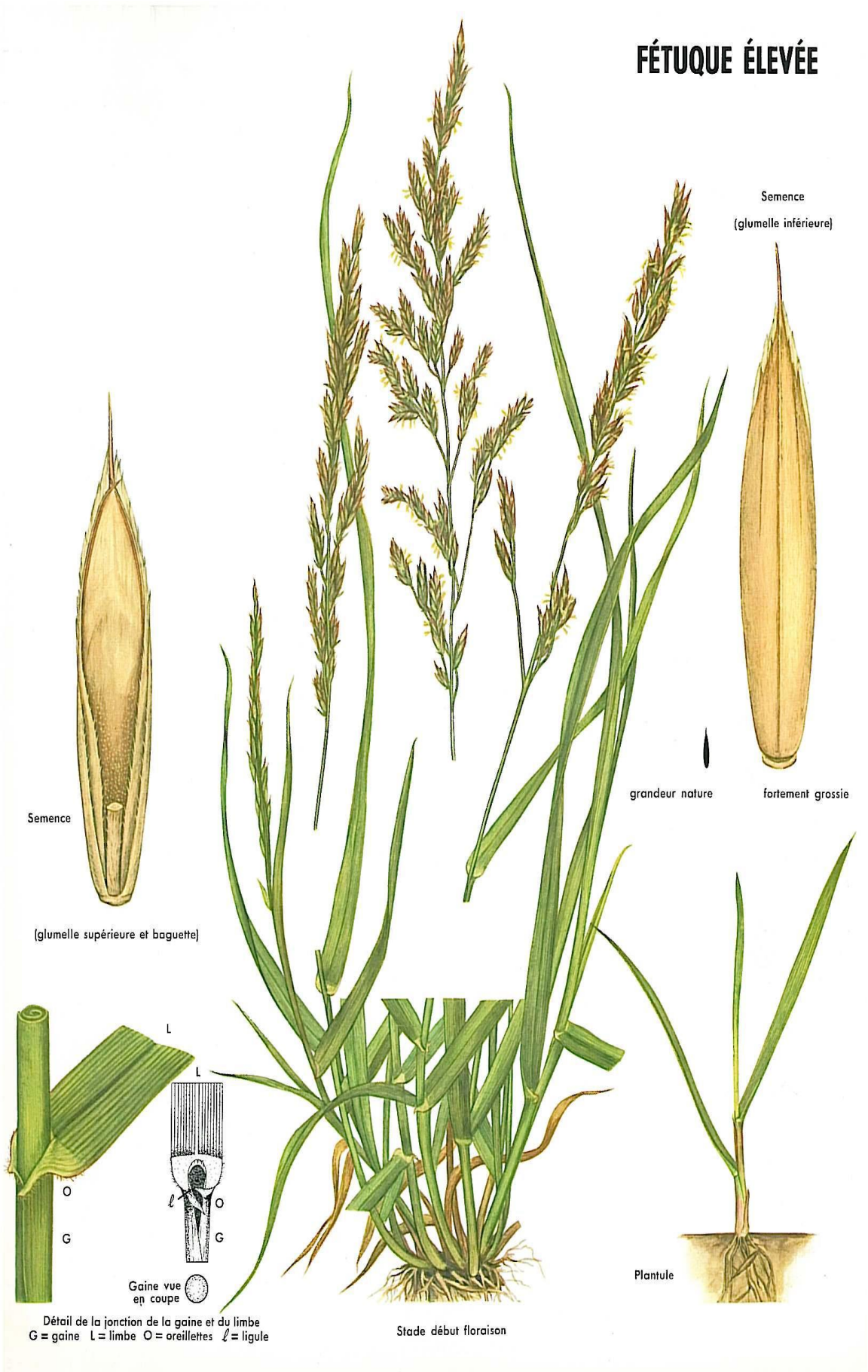


Figure 1.7: Morphology of *Festuca arundinacea* Schreb. (Fiche Acta 406 de l'Association de Coordination Technique Agricole, 1987).

2.4. Germination des graines et Environnement

2.4.1. La germination

La germination des graines est un processus, dans lequel des modifications morphologiques et physiologiques conduisent à l'activation de l'embryon et sa croissance. La germination, commence par l'absorption d'eau par les graines (imbibition), suivi par l'allongement de l'axe embryonnaire. Lorsque la radicule est sortie des téguments de graine, le processus de germination des graines est terminé (Bewley et Black, 1994; Hermann et al., 2007).

La germination des graines est contrôlée par de nombreux de mécanismes nécessaires à la croissance et au développement de l'axe embryonnaire qui conduisent à l'obtention éventuelle d'une nouvelle plante (Miransari and Smith, 2014). Pour que la germination se produise, les graines doivent être hydratées dans des conditions qui promeuvent le métabolisme, comme une température convenable et la présence d'oxygène.

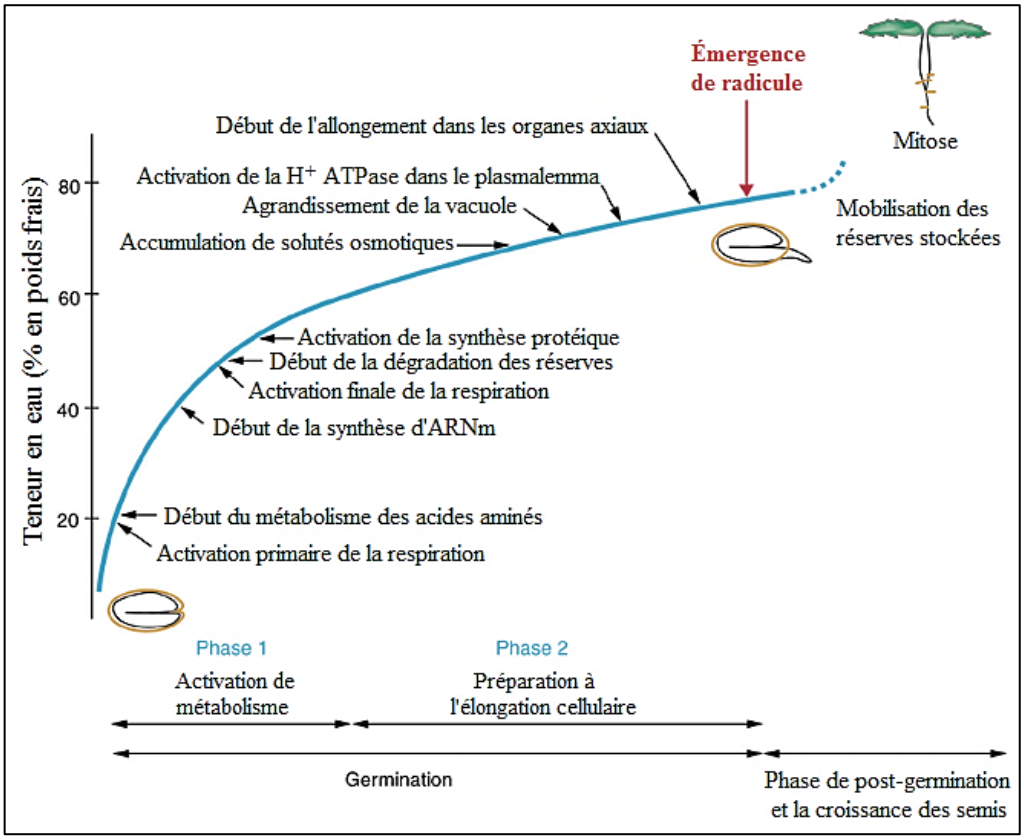


Figure 1.8: Les événements cellulaires et métaboliques déclenchés par l'absorption d'eau pendant la germination des graines (d'après Bove et al., 2001).

L'absorption de l'eau par la graine est considérée comme un déclencheur de la germination et des processus métaboliques qui se produisent en conséquence. L'afflux initial (**Phase I**, imbibition) est le résultat du très faible potentiel en eau des matrices sèches de la graine, l'imbibition rapide dans cette phase déclenche la reprise du métabolisme de base. Au cours de cette phase, connue sous le nom d'imbibition « physique », une activation progressive des voies métaboliques résulte de l'augmentation graduelle de l'hydratation. Lorsque le taux d'hydratation dépasse 60%, la vitesse d'hydratation ralentit (phase II) et de nouveaux mécanismes physiologiques préparent l'expansion cellulaire dans les axes embryonnaires, aboutissant au début de l'élongation cellulaire. Les substances osmotiques actives (solutés, tels que sucres, acides aminés et ions potassium) sont accumulées et l'acidification de la paroi cellulaire entraîne un relâchement des liaisons entre ses polymères. Ces évènements coïncident avec l'activation de l'ATPase à protons dans le plasmalemme, ce qui entraîne une augmentation supplémentaire de l'absorption d'eau qui peut coïncider avec l'affaiblissement des tissus environnants (l'endosperme) lorsque les axes embryonnaires s'allongent (Bewley, 2001 ; Bove et al., 2001; Baskin et Baskin, 2014). Il y a plusieurs raisons pour lesquelles les graines peuvent ne pas germer dans des conditions environnementales favorables, y compris des niveaux adéquats d'eau, de température, de lumière et de gaz. La première, est que de nombreuses espèces ont des proportions élevées de graines sans embryons ou de graines contenant des embryons non viables. La deuxième est qu'un grand nombre de populations végétales produisent des graines dormantes, **c'est-à-dire des graines viables qui ne peuvent germer dans des conditions favorables en raison de certaines caractéristiques intrinsèques** (Baskin et Baskin, 2014).

2.4.2. La dormance de graines

Du point de vue agronomique et écologique, Il est important que les plantes commencent leur cycle de vie au début de la saison de croissance. Afin d'établir les plantules au bon moment, les graines de la plupart des espèces végétales ont évalué la capacité de chronométrer leur germination. Ceci est contrôlé par la dormance des graines, qui est définie comme l'incapacité d'une graine viable intacte à terminer sa germination dans des conditions favorables (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006)**.**

L'induction de la dormance des graines se produit au cours de leur maturation sur la plante mère. Ainsi, les facteurs environnementaux vécus par la plante-mère au cours de la

maturation des graines comme la température, la lumière et les nitrates du sol influent sur le niveau de dormance (Baskin et Baskin, 2004; He et al., 2014; Shu et al., 2015).

Les graines peuvent être dormantes (dormance primaire) ou non dormantes à la fin de leur développement, selon le génotype et l'environnement maternel. La dormance peut être atténuée par divers facteurs environnementaux. Alternativement, les graines non dormantes peuvent être induites en dormance (dormance secondaire) par certains de ces mêmes facteurs. Les graines peuvent circuler de façon saisonnière entre des états de dormance et non dormance. Les graines non dormantes peuvent progresser vers la germination encore une fois, sous l'influence de certains des mêmes facteurs environnementaux (**Figure 1.9**).

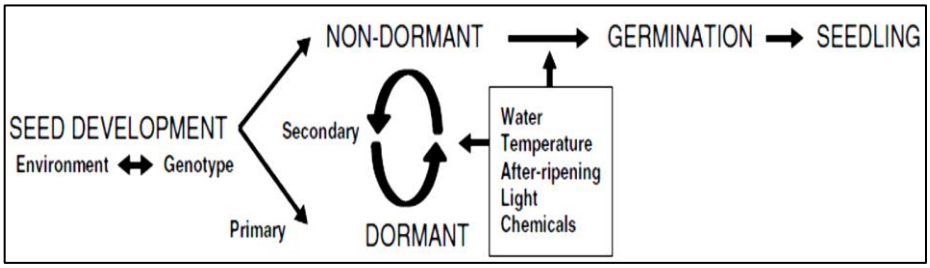


Figure 1.9. Relations entre la dormance des graines et la germination (Bewley et al., 2013a).

La dormance est un processus qui implique des interactions entre deux facteurs de croissance des plantes, les gibbérellines (GAS) et l'acide abscissique (ABA) (Bewley, 1997; Grappin et al., 2000). D'autres processus ont été identifiés comme intervenant dans l'élimination de la dormance pendant le stockage des graines, avec un rôle important pour les réactions oxydatives non enzymatiques. Cependant, les relations entre les différents régulateurs de la dormance ne sont pas encore bien comprises (Bewley et Black, 1994 ; Née et al., 2017).

L'ABA est nécessaire à l'induction de la dormance au cours de la maturation des graines et le GA pour la germination (Baskin et Baskin, 2014; Née et al., 2017). Ces deux hormones influent négativement de façon réciproque la biosynthèse et les voies de signalisation (« signaling pathways »). C'est surtout l'équilibre entre les deux hormones qui détermine la capacité germinative (**Figure 1.10a**).

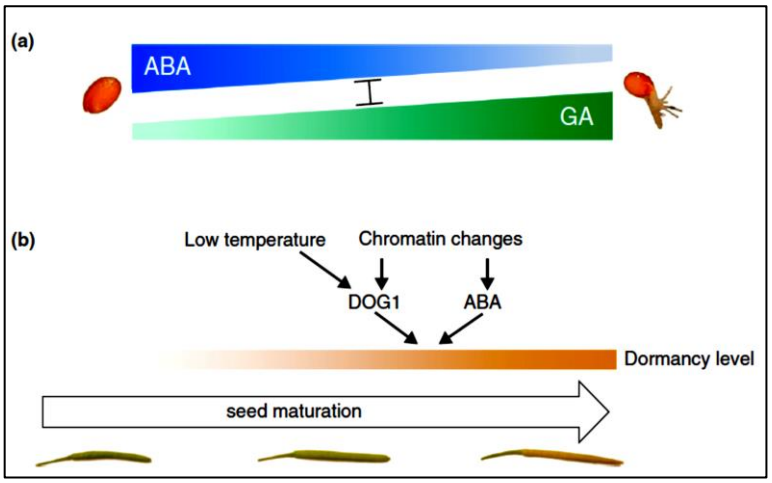


Figure 1.10: Les rôles des facteurs environnementaux et endogènes dans la dormance des graines. a) La dormance et la germination sont régies par l'équilibre entre ABA et GA. b) Facteurs contrôlant l'induction de la dormance pendant la maturation des graines. Les facteurs environnementaux (température) et de développement (changements chromatiniques) régulent la protéine de dormance DOG1 et l'hormone ABA (Née et al., 2017).

Plus récemment, il a été démontré que d'autres hormones et quelques gènes contribuent à la dormance et à la germination (**Figure 1.10b**). Parmi ceux-ci, un rôle important a été identifié pour l'éthylène, en partie en contrecarrant les effets de l'ABA (Bentsink et al., 2006; Linkies et Leubner-Metzger, 2012; Zhang et al., 2013). En effet, plusieurs gènes ont été identifiés qui régulent exclusivement la dormance et la germination. Les deux principaux gènes représentatifs de ce groupe sont *DELAY OF GERMINATION 1* (*DOG1*) et *REDUCED DORMANCY 5* (*RDO5*). Ces deux gènes jouent également un rôle important dans la variation naturelle de la dormance et ont été identifiés comme des *loci* de caractères quantitatifs pour la dormance chez *Arabidopsis*. Le *DOG1* est impliqué dans l'augmentation de la dormance par de basses températures pendant la maturation des graines (**Figure 1.10b**). Le gène *RDO5* code pour une pseudophosphatase qui affecte le phosphoprotéome pendant l'imbibition précoce des graines (Bentsink et al., 2006; Née et al., 2017; Xiang et al., 2016). D'autres régulateurs de dormance ont récemment été identifiés par clonage de *loci* de caractères quantitatifs pour la dormance chez des espèces cultivées tels que « *Seed dormancy 4* » (*Sdr4*) chez le riz (Sugimoto et al., 2010) et « *Alanine Aminotransferase* » (*AlaAT*) chez l'orge (Sato et al., 2016). D'autres gènes sont plus généralement exprimés, comme « *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3* » (*MKK3*), qui a été identifié chez l'orge et le blé (Nakamura et al., 2016; Torada et al., 2016).

La dormance des graines a un système de classification complet qui comprend cinq classes: dormance physiologique (PD), dormance morphologique (MD), dormance morphophysiologique (MPD), dormance physique (PY) et dormance combinatoire (PY + PD) (Baskin et Baskin, 2004).

i) Les graines avec dormance physiologique (DP) sont perméables à l'eau et, selon Nikolaeva (1969, 1977), elles ont un mécanisme d'inhibition physiologique dans l'embryon qui empêche l'émergence des radicules. ii) Les graines avec dormance morphologique (MD) ont des embryons différenciés (ont radicelle et cotylédon), mais sous-développés ou indifférenciés mais différenciés par la suite et doivent se développer avant l'émergence de la radicule. iii) La dormance morphophysiologique (MPD) se produit dans les graines d'embryons différenciés, sous-développés, de forme linéaire, rudimentaire ou spatulée. iv) Les graines avec dormance physique (PY) ont des téguments et des fruits imperméables à l'eau qui empêchent la germination. v) La présence de PY et de PD dans une seule graine est appelée dormance combinatoire (PY+PD) (Nikolaeva, 1969), et la germination n'a cours que lorsque les deux types de dormance ont été rompus (Baskin et Baskin, 2014).

2.4.3. La viabilité des graines

Une graine viable est une graine capable de germer dans des conditions appropriées. La définition inclut les graines dormantes mais viables, auquel cas la dormance doit être levée avant que la viabilité puisse être mesurée par germination. Elle est affectée par un certain nombre de facteurs tels que la capacité de la plante mère à produire des graines viables, les dommages causés par les prédateurs et les agents pathogènes, et les conditions environnementales comme l'anoxie ou la température (Scharpf, 1970). L'âge de la graine affecte également sa santé et sa capacité à germer. Les graines ont des embryons vivants dont les cellules meurent au cours du temps sans pouvoir être remplacées (Shaban, 2013).

Un autre aspect important à mentionner est l'inter-population et interannuelle de la viabilité des graines. La viabilité des graines d'*Eremanthus incanus* (Asteraceae) variait significativement à différents moments de la collecte (Nunes et al., 2016), et plusieurs populations d'*Eremanthus erythropappus* ont produit des pourcentages remarquablement différents de graines vides (Feitosa et al., 2009).

2.4.4. Contrôle environnemental de la germination

Les interactions des mécanismes de dormance des graines avec les conditions environnementales passées et actuelles déterminent si et quelle fraction des graines d'un lot germera à un moment donné. Une fois que la dormance a été éliminée par la réponse de la graine aux indices du microenvironnement, la sensibilité à l'environnement actuel, en particulier à l'eau, la température, la lumière et les nutriments, détermine la vitesse et le pourcentage de germination des graines qui ne dormiront plus (Bewley et Black, 1994). En plus, après la germination, les Plantules peuvent ne pas émerger ou ne pas survivre en raison de facteurs physiques (croûte du sol, profondeur d'enfouissement), de prédation ou de maladie. Tous ces facteurs constituent un réseau interactif de signaux environnementaux et de réponses biologiques qui déterminent l'entrée et la sortie des graines de la banque de graines dans le sol (Bewley et al., 2013).

2.4.4.1. L'eau

L'eau est essentielle dans le développement des graines (Baskin et Baskin, 2014). Pendant la maturation de l'embryon sur la plante mère, les graines subissent habituellement un processus de dessiccation qui entraîne l'inactivation du métabolisme de l'embryon.

Une fois les graines installées dans des conditions adéquates, la germination commence par l'absorption d'eau par la graine sèche. L'imbibition des graines déclenche des changements hormonaux qui entraîneront la réactivation des enzymes (Bewley et Black, 1994; Baskin et Baskin, 2014).

L'imbibition dépend largement des conditions environnementales telles que la température et le potentiel osmotique, ainsi que de la perméabilité à l'eau de tégument de graines ou de fruits (Baskin et Baskin, 2014). Cependant, la germination peut être inhibée si la quantité d'eau est trop faible ou trop élevée. L'absorption d'eau par la graine peut être divisée en trois phases (**Figure 1.8**). Les changements dans les activités physiologiques et biochimiques au cours de la germination des graines ont été corrélés avec ces phases.

2.4.4.2. La lumière

La réaction des graines à la lumière peut contrôler le moment de l'émergence des plantules dans le champ (Benech-Arnold et al., 2000). Les graines de plusieurs espèces germent à des pourcentages élevés à la fois dans la lumière et dans l'obscurité (Baskin et Baskin, 1988). Cependant, les graines peuvent germer seulement à la lumière (Baskin et Baskin, 2003), à un pourcentage plus élevé en lumière qu'en obscurité (Grime et al., 1981), à

un pourcentage plus élevé en obscurité que dans la lumière ou seulement dans l'obscurité (Morgan et Lunt, 1994).

Chez certaines espèces, il a été démontré que la lumière induit la dormance. De plus, l'inhibition par la lumière de la germination des graines dépend également des espèces et de la qualité de la lumière. La stratification obscure freine la dormance de nombreuses graines et entraîne une augmentation graduelle de la sensibilité à la lumière des graines et de la germination lors de l'exposition à la lumière (Steadman, 2004).

2.4.4.3. La température

La température est un facteur environnemental majeur qui contrôle l'émergence soit en déterminant la capacité et la vitesse de germination, soit en levant ou en induisant la dormance (Baskin et Baskin, 1998; Bewley et Black, 1994; Brändel, 2004). Il est important de souligner que la levée de dormance et la germination sont deux processus différents et peuvent avoir des exigences différentes (Thompson et Ooi, 2010; Vleeshouwers et al., 1995). En d'autres termes, les graines peuvent nécessiter un ensemble de conditions environnementales pour lever la dormance et un autre pour la germination (Baskin et Baskin, 2014).

Ainsi, la température agit pour réguler la germination de trois façons: I) en déterminant la capacité et la vitesse de germination, II) en levant la dormance primaire et/ou secondaire, et III) en induisant la dormance secondaire (Bewley et Black, 1994).

La température joue un rôle important dans l'absorption de l'eau et la réactivation du métabolisme (Bewley et al., 2013; Weitbrecht et al., 2011). En général, une augmentation progressive de la température raccourcit le temps nécessaire à la germination jusqu'à ce qu'elle atteigne une température optimale et le pourcentage final maximal de germination (Ahmed L, 2015), qui varie selon les espèces.

Il est reconnu depuis le milieu des années 1800 que trois températures cardinales (minimale, optimale et maximale) décrivent la gamme des températures sur lesquelles les graines d'une espèce particulière peuvent germer. La température minimale est la température la plus basse à laquelle une graine peut germer. La température optimale est la température à laquelle le pourcentage de germination est le plus élevé, et la température maximale est la température la plus élevée à laquelle une graine peut germer. Les températures cardinales pour la germination sont généralement liées à la gamme d'adaptation environnementale d'une espèce donnée et servent à faire correspondre le

moment de la germination aux conditions favorables à la croissance et au développement ultérieur des plantules (Bewley et al., 2013).

Lorsque la température s'écarte de la température optimale, plusieurs changements physiologiques, biochimiques et moléculaires se produisent à l'intérieur des plantes afin de maintenir les processus de croissance et de développement et, très probablement, l'homéostasie cellulaire (Long et al., 2015; Née et al., 2017). La plupart des plantes montrent une capacité considérable à ajuster leurs caractéristiques à leurs températures de croissance, ce qui permet aux plantes de se développer plus efficacement à de nouvelles températures de croissance.

2.4.5. Impacts du changement climatique sur la germination des graines

Le changement climatique est prévalent dans le monde entier et est considéré comme l'un des challenges les plus critiques du 21ème siècle. On s'attend à ce que la température mondiale augmente de 3,7 à 4,8˚C au cours des 100 prochaines années, selon la moyenne mondiale et les températures extrêmes (IPCC, 2014). Le changement climatique peut avoir une plus grande influence sur la régénération, le recrutement, la survie et la diversité des plantes (Adler et Hillerislambers, 2008). Ce réchauffement global a non seulement augmenté les températures moyennes, mais il a également réduit la plage de températures diurnes, la température minimale ayant augmenté deux fois plus vite que la température maximale (Walther et al., 2002). La germination est la phase de transition entre la graine et la plantule (Meyer et al., 1997). Elle est fortement affectée par les conditions environnementales (Baskin et Baskin, 1988).

Face au changement climatique, il existe des incertitudes quant à la capacité d'adaptation des prairies aux températures extrêmes attendues. La température est l'un des principaux facteurs qui régulent le fonctionnement des plantes. Il agit sur l'ensemble de la plante et de son cycle (de la germination à la maturité). Il est donc important d'anticiper les effets du changement climatique attendus et de trouver des solutions adéquates pour la production agricole.

La température est le principal signal qui détermine le moment des deux principales transitions du cycle de vie des plantes : la germination (transition de la graine à la plante) et la reproduction (de la plante à la graine) qui sont les composantes clés du cycle de vie des plantes. La température étant le principal facteur contrôlant l'état de dormance des graines pour la majorité des espèces (Baskin et Baskin, 1998), certaines caractéristiques du

changement climatique peuvent amener les graines à briser la dormance plus facilement que par le passé. Par contre, si la libération de la dormance nécessite un refroidissement (comme c'est le cas pour de nombreuses espèces à germination au printemps), une température accrue ou une période froide plus courte peut retarder la levée de dormance ou même empêcher complètement la germination des graines (Fenner, 2000). De plus, la température peut aussi affecter directement le processus de germination. Le réchauffement est susceptible d'affecter à la fois le pourcentage et la vitesse de germination des graines (Bewley et al., 2013).

Il est important d'adapter les systèmes de production des prairies à ces nouvelles conditions environnementales. L'amélioration de ces systèmes pourrait impliquer l'utilisation de communautés multi-spécifiques ainsi que de populations multi-génotypiques. La sélection de nouvelles variétés pourrait contribuer à sécuriser la production alimentaire dans le nouveau contexte climatique. La base de l'amélioration est la variabilité génétique de chaque espèce.

Chez les graminées fourragères, comme chez d'autres espèces, les connaissances sur la diversité de réponses germinatives à la température restent fragmentaires (Ahmed, 2015).

3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Cette thèse a été réalisée en poursuivant deux objectifs.

L'objectif majeur de ce travail est d'analyser la diversité génétique de la réponse germinative à la température chez des populations de trois espèces de graminées fourragères pérennes : ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.), dactyle (*Dactylis glomerata* L.).

L'objectif secondaire est d'analyser la diversité génétique de la réponse germinative à la température chez deux espèces domestiquées de graminées annuelles, le blé (*Triticum aestivum* L.) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.), afin de comparer ces réponses à celles de nos graminées fourragères pérennes.

Les résultats attendus de ce travail doivent contribuer à répondre aux questions de recherche suivantes:

- ✓ *Quel est l'étendue de la variation de la réponse germinative à la température chez les espèces étudiées ?*
- ✓ *Est-ce que la variation de la réponse germinative à la température chez les populations étudiées est associée aux conditions climatiques de leur site de collecte?*
- ✓ *Est-ce que il y un effet du lot de graines dans les mêmes populations (âge, conditions de production, méthode de stockage) sur la réponse germinative à la température ?*
- ✓ *Est-ce que les espèces graminées fourragères pérennes répondent à la température de façon semblable aux graminées annuelles?*
- ✓ *Est-ce que la variabilité de la réponse germinative à la température a une origine génétique et si oui, quelles sont les régions du génome impliquées ?*

4. MATÉRIEL ET MÉTHODE GÉNÉRALE

4.1. Matériel végétal

Dans cette étude, 628 lots de graines appartenant à cinq espèces de graminées ont été évalués. Le *Lolium perenne* L., est représenté par 373 lots. Parmi ces lots, 195 ont été obtenus du Centre de ressources biologiques des espèces fourragères et à gazon (CRB) de l'URP3F-INRA de Lusignan, et 122 ont été obtenus du Leibniz Institut de Génétique Végétale et de Recherche sur Les Plantes Cultivées (IPK) à Gatersleben, Allemagne et 56 de différents obtenteurs de variétés fourragères (Annexe 1.1).

Cent cinquante-huit lots de *Festuca arundinacea* Schreb ont été évalués. Parmi ces lots, 124 ont été obtenus du CRB de Lusignan et 34 de différents obtenteurs de variétés fourragères (Annexe 1.2).

Dactylis glomerata L, est représenté par 11 lots. Parmi ces lots, trois lots ont été obtenus du CRB de Lusignan et le reste de différents autres fournisseurs (Annexe 1.3).

Afin de comparer les réponses germinatives à la température des graines d'espèces fourragères pérennes et des graines de graminées annuelles, nous avons inclus 62 variétés de blé (*Triticum aestivum* L.) et 24 variétés d'orge (*Hordeum vulgare L*.), les graines ont été obtenues du « Plant Breeding Institute », Université de Sydney, Australie.

Les graines ont été stockées dans des enveloppes opaques dans l'obscurité à 5 °C et 30% d'humidité relative (HR), jusqu'à ce qu'elles soient utilisées.

4.2. Test de germination

Pour chaque lot, quatre répétitions de 100 graines des espèces fourragères ou de 25 graines de céréales ont été placées sur une couche de papier Wattman dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. Chaque boîte est identifiée par un code à barres qui indique le lot, la répétition et le traitement. Ces graines sont comptées manuellement ou à l'aide d'un appareil à compteur de graines (CONTADOR, Pfeuffer, Germany). Le papier Wattman, préalablement stérilisé, a été ensuite humidifié avec 5 ml d'eau déionisée et stérilisée à l'autoclave. Pour les trois espèces fourragères, pour lever une éventuelle dormance les graines ont subi une stratification humide au froid par placement des boîtes de Pétri dans l'obscurité pendant 7 jours à 5 °C et 30 % d'humidité relative (HR).

Les graines sont mises à germer dans l'obscurité dans des chambres de culture maintenues à températures constantes de 5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C (Tableau 1.1). La température et l'humidité ont été enregistrées en continue à l'aide des deux enregistreurs

de température, d'humidité et de point de rosée autonomes (EL-USB-2 +, Lascar Electronics Ltd., Salisbury, Royaume-Uni) placés entre les boîtes de Pétri. Un appareil a enregistré des valeurs toutes les heures et l'autre toutes les minutes. En plus de ces deux dispositifs, la température autour des boîtiers était suivie en continue avec des thermocouples reliés à un PC de contrôle.

Tableau 1.1: Température, l'humidité relative et évapore pressure déficit (VPD) des chambres de germination.

Température °C	Humidité relative %	VPD (KPa)	Période de suivi (h)
5	74	0.23	665 – 8201
10	75	0.31	193 – 1729
15,5	52	0.85	80 – 2079
21	66	0.85	65 – 1466
26,5	83	0.59	64 – 1775
32	70	1.43	89 – 3868

Les comptages de germination ont été effectués à des intervalles de temps et durées variables. En effet, les périodes de suivi dépendent de la température et de la vitesse de germination (Tableau 1.1). Les graines étaient considérées comme germées lorsque la radicule et/ou le coléoptile étaient émergés d'au moins 2 mm.

À chaque comptage, les graines germées ont été comptées et retirées des boîtes de Pétri. De l'eau déionisée et stérilisée à l'autoclave a été ajoutée à la température de chaque traitement, selon les besoins pour assurer que l'humidité ne soit pas limitative pour la germination. La valeur de chaque comptage est inscrite dans le tableau présent sur la boîte. Les graines qui n'ont pas germées à 5 et 32 °C ont été transférées pour germer à 25 °C, afin de vérifier qu'elles étaient encore capables de germer.

En raison du grand nombre de valeurs attendues au cours de cette étude et pour faciliter leurs acquisition gestion et traitement, une interface spécifique a été développée sous Microsoft Access par Stéphane FOURTIER (Assistant Ingénieur à l'INRA de Lusignan) pour créer une base des données relationnelle. Grâce à cette base de données, il est possible d'intégrer toutes les informations relatives aux lots. L'outil permet à son utilisateur de générer des étiquettes "code à barres" pour identifier chacune des boîtes. Cette interface facilite l'enregistrement des données qui s'effectue par appel de l'identifiant "boite" par flash du code à barres à l'aide d'un pistolet de lecture. Ensuite la valeur de comptage est saisie par l'utilisateur, son enregistrement dans la table des comptages lui associe date et heure précise à chaque fois.

Chapitre II:

Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température

1. INTRODUCTION

La germination des graines est une étape importante dans le cycle de vie des plantes. Elle affecte le développement, la survie et la dynamique des populations. La germination commence par l'absorption de l'eau par la graine et se termine par l'allongement de l'axe embryonnaire en dehors du tégument (Baskin and Baskin, 2014; Bewley and Black, 1994).

La germination des graines joue un rôle fondamental dans la détermination du comportement écologique et la répartition géographique des plantes (Thompson, 1970). Elle réagit à de nombreux signaux environnementaux, notamment la température, le potentiel en H_2O, la lumière et l'O_2 (Bewley et Black, 1994). La vitesse et le temps de germination des graines sont modulés par le changement des conditions environnementales et diffèrent selon les années et les lieux géographiques. Parmi les facteurs environnementaux qui affectent le pourcentage et la vitesse de germination, la température est l'un des plus importants, en raison de ses effets sur la détérioration des graines, la perte de dormance et le processus de germination lui-même (Bewley and Black, 1994b; McGinnies, 1960; Roberts, 1987). Les graines de prairie peuvent aussi présenter une maturité plus précoce et des rendements réduits sous des températures plus chaudes (Wheeler et al., 2000).

Les changements dans les conditions environnementales, comme l'augmentation des températures et du CO_2 atmosphérique et la diminution des précipitations, peuvent influer sur la distribution historique de la production de graminées dans les régions tempérées. Le changement de température moyenne annuelle de 3 °C peut entraîner un changement des isothermes de 300 à 400 km de latitude et jusqu'à 500 km d'altitude (Hughes, 2000).

Par conséquent, il est nécessaire de comprendre la réponse germinative des graminées prairiales pérennes de zone tempérée à la température afin d'élaborer des stratégies pour un établissement réussi des peuplements naturels et semés. Cela doit aussi être utilisé pour l'amélioration génétique et la création de variétés adaptées aux climats futurs. L'objectif de cette étude était de déterminer les effets de la température sur une large gamme de lots sauvages et de variétés de *Lolium perenne* L. et *Festuca arundinacea* Schreb., en plus d'un petit nombre de lots de *Dactylis glomerata* L.

Cinq cent quarante-deux lots de graines de trois espèces ont été étudiés, à des températures constantes, dans une gamme de 5 à 32˚C, afin de tester l'hypothèse suivante : **« Au sein des espèces, on peut observer différentes réponses germinatives des lots de graines à une gamme de températures constantes »**.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal et test de germination

Dans cette étude, cinq cent quarante-deux lots de trois espèces de graminées ont été évalués, les graines ont été obtenues de différentes sources et de différentes conditions pédoclimatiques. *Lolium perenne* L. est représenté par trois cent soixante-treize lots (Annexe 1.1). Cent cinquante-huit lots de *Festuca arundinacea* Schreb., ont été évalués (Annexe 1.2). *Dactylis glomerata* L. est représenté par dix lots (Annexe 1.3). De plus, soixante-deux lots de blé (*Triticum aestivum* L.) et vingt-quatre lots d'orge (*Hordeum vulgare* L.) ont également été inclus, à des fins de comparaison.

Pour le test de germination, les traitements de température étaient 5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C et les graines ont été obtenues de différentes sources. Comme décrit en détail dans le premier chapitre.

2.2. Analyses des données

Des analyses exploratoires des données ont été effectuées afin d'identifier des données aberrantes ou erronées. Cette analyse a aussi permis d'avoir une représentation graphique des données qui a servi de base pour les analyses ultérieures.

2.3. Pourcentages de germination

Pour chaque lot, les pourcentages de germination observés dans les quatre répétitions ont été regroupés et représentés en fonction de la température, puis des graphiques en boîtes à moustaches ont été effectués pour chaque ensemble de données, afin de montrer les pourcentages maximaux de germination de chaque lot en fonction des températures.

2.4. Vitesse de germination

Dans cette analyse, plusieurs paramètres qui relient la germination au temps ont été calculés: le temps de début de germination (*tc*), la vitesse maximale de germination (α) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$).

Pour chaque traitement de température et répétition, le pourcentage cumulatif des valeurs de germination au cours du temps a été ajusté en utilisant une hyperbole non rectangulaire de la forme :

$$y = \left(\frac{1}{2\theta}\right) \cdot \left(\alpha \cdot (t - tc) + y_{\max} - \sqrt{(\alpha.(t - tc) + y_{\max})^2 - (4.\theta.\alpha(t - tc).y_{\max})}\right)$$

où y est le pourcentage cumulé de germination (exprimée en nombre de graines) ; θ est un paramètre de courbure (sans unité) ; α est la vitesse de germination maximal (graine par heure où nombre d'individus par heure) ; *t* est le temps (heure) ; *tc* est le délai de début de germination (heure) et le retard de germination ; y_{max} est le pourcentage de germination maximale. Un avantage d'un tel modèle est la possibilité d'attribuer une signification écophysiologique aux paramètres.

Pour chaque répétition, le temps nécessaire pour atteindre une proportion de 95 % des graines germées maximum, t_k, peut être calculée comme suit :

$$t_k = tc + \left[\frac{k.y_{max} - k^2.y_{max}.\theta}{\alpha.(1-k)}\right]$$

2.5. Analyses multivariées

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées pour évaluer la variabilité de la capacité germinative et des paramètres associés à la vitesse de germination entre les lots et pour classer des lots de graines dans chaque espèce en réponse aux températures.

L'ACP est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour l'analyse des données multivariée (Abdi and Williams, 2010), elle peut être utilisée pour saisir une grande partie de l'information dans une grande matrice de données multidimensionnelles avec un nombre de dimensions moindre, de sorte que l'ensemble des données réexprimé puisse être visualisé plus facilement et quantitativement (Penkova, 2017).

Une deuxième méthode d'analyse des données, l'analyse de grappes, peut également être utilisée pour explorer les relations entre les lots de graines. La méthode est utilisée pour trouver des similitudes entre les lots de graines et pour produire une représentation graphique de la façon dont ces lots sont regroupés. Son avantage est que les grappes sont assemblées en utilisant toute la variance de l'ensemble des données (Xue et al., 2011). L'utilisation de l'ACP de concert avec l'analyse en grappes fournit plus d'information que l'utilisation de l'une ou l'autre méthode seule.

Tout d'abord, l'ACP permet de voir si les six traitements contribuent de façon similaire aux axes synthétiques et si les lots de graines dans chaque espèce se comportent de la même manière dans les six traitements.

Ensuite, une analyse de classification hiérarchique en grappes sur les composantes principales (HCPC) a été effectuée sur des lots de graines de chaque espèce en réponse aux

températures, pour organiser les données observées en structures sémantiques et résumer nos larges ensembles de données. Pour ce faire, les moyennes des quatre répétitions sur les six traitements de chaque lot ont été utilisées.

Ultérieurement, des ellipses de confiance autour des catégories d'années de récolte ont été effectuées afin d'évaluer l'impact des années de récolte sur la capacité germinative des lots de graines en réponse aux températures. Nous avons réalisé l'ACP et HCPC avec le package FactoMineR du logiciel R (R Development Core Team, 2012).

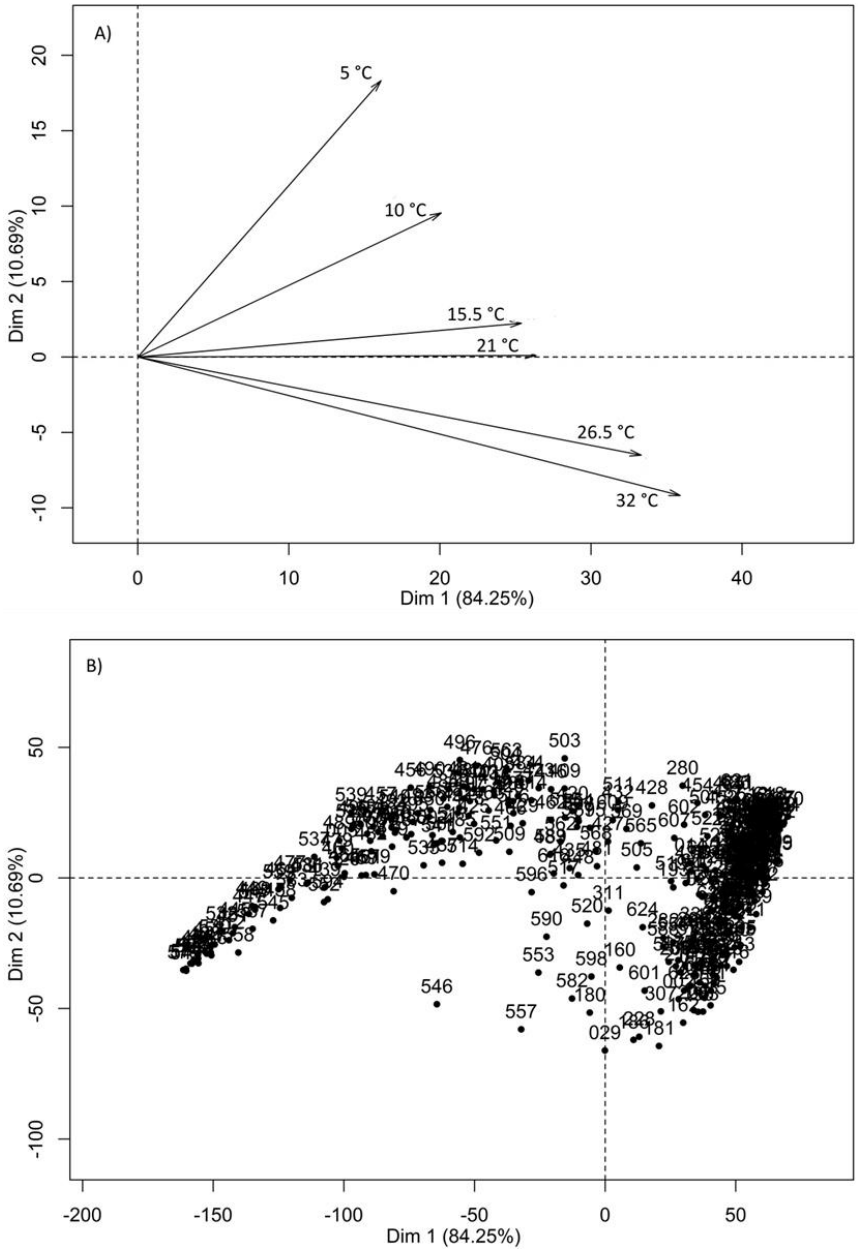


Figure 2.1**:** Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur les pourcentages de germination observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 373 lots de graines de ray-grass anglais**.** A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

3. RÉSULTATS

3.1. Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Lolium perenne* L.

3.1.1. Effets de la température sur le pourcentage de germination maximale

Dans cette analyse, trois cent soixante-treize lots de ray-grass anglais ont été évalués. Les graines ont été obtenues de différentes sources et les tests de germination ont été faits selon six traitements (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 ˚C), comme décrit en détail dans le premier chapitre.

Pour chaque lot, des graphiques de type boîtes à moustaches ont été faits pour chaque ensemble de données en fonction des températures de germination (Annexe 2.1). Ces graphiques montrent bien qu'il existe une forte variabilité en réponse aux températures entre les lots de ray-grass et qu'il y a une forte différence en pourcentage de germination entre les températures dans le même lot.

Ensuite, la variation entre les lots de ray-grass a été illustrée par une analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur l'ensemble de leur réponse aux températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) (**Figure 2.1**). Les deux premiers axes représentent 95 % de variabilité des données. L'axe 1, qui représente un total de 84% de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures, notamment le traitement à 21 °C. L'axe 2, qui correspond à 11 % de la variance totale, a été positivement corrélé aux traitements 5; 10; 15,5 °C et négativement corrélé aux traitements 26,5 et 32 °C (**Figure 2.1A**). La **figure 2.1B** montre que les lots de ray-grass ont été distribués sur l'ensemble du diagramme. Le pourcentage de germination maximale de chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 1, et les pourcentages de germination maximale des traitements dans chaque lot ont été distingués en fonction de l'axe 2. On déduit de cette analyse qu'il y avait une forte variabilité de la réponse aux températures entre les lots de graines.

Ensuite, l'analyse hiérarchique en grappes sur les composantes principales (HCPC) a classé les lots de ray-grass en cinq groupes (**Figure 2.2**). Ces classifications ont été effectuées sur la base du pourcentage de germination maximale de chaque lot et le pourcentage moyen de germination à chacune des températures pour chaque lot.

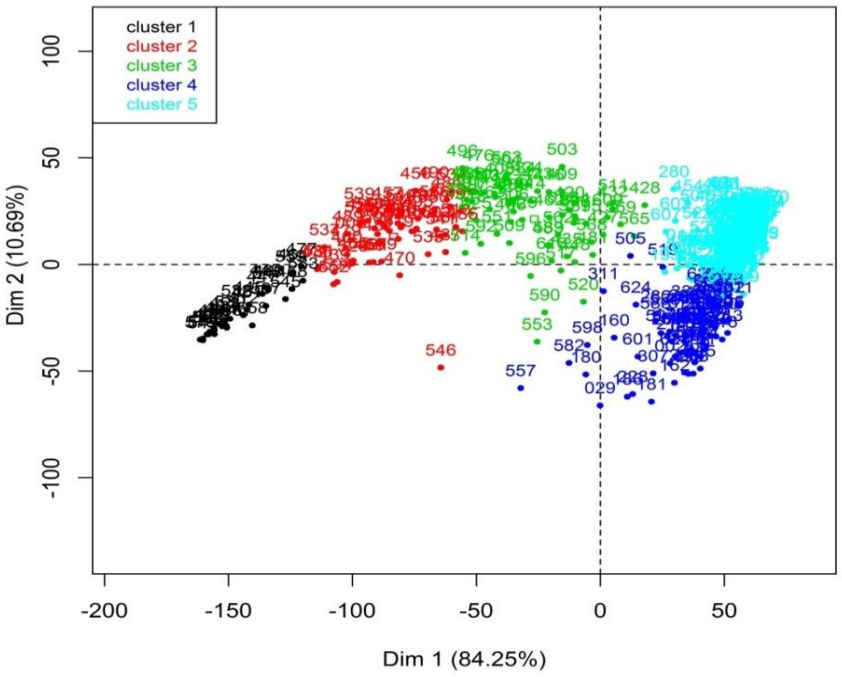


Figure 2.2: Classification des lots individuels sur la base de l'analyse des composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC), calculé sur les pourcentages de germination observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 373 lots de graines de ray-grass anglais. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

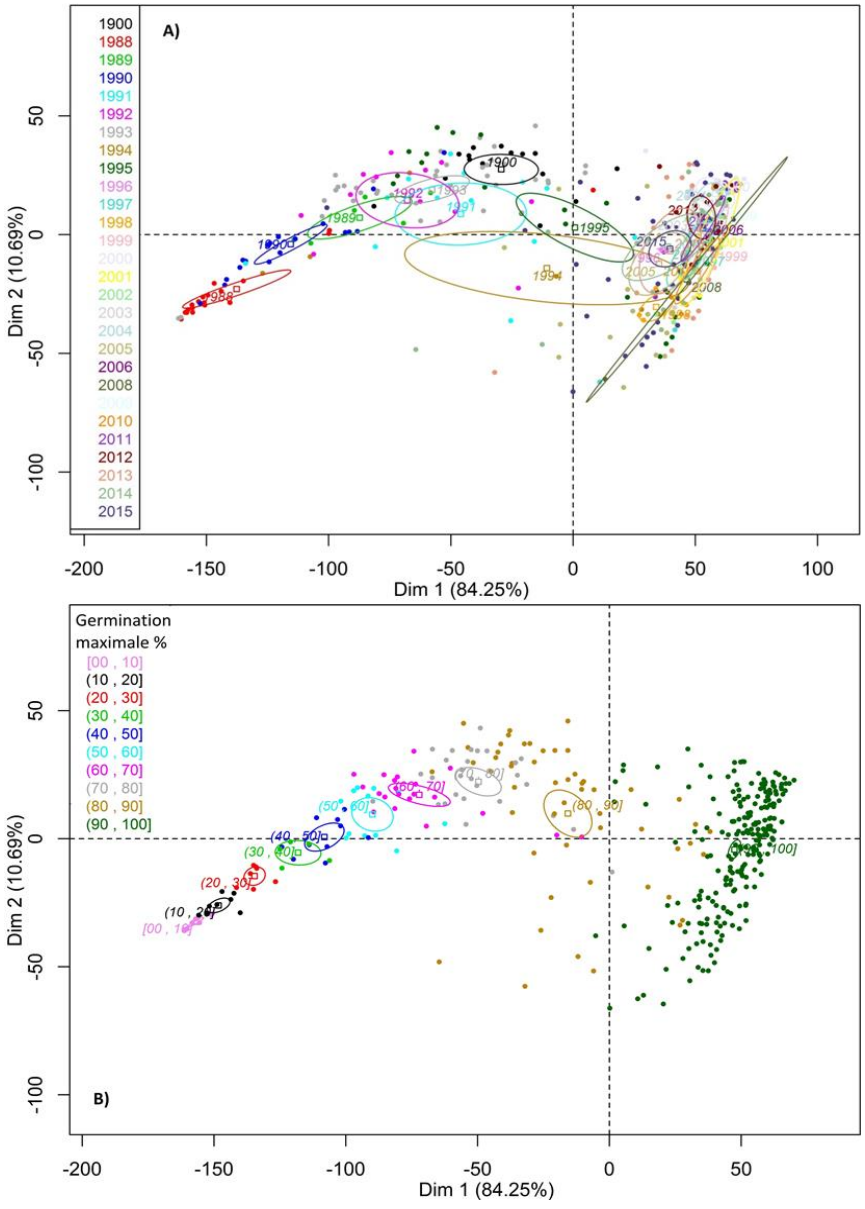


Figure 2.3: A) Ellipse de confiance autour des catégories de l'année de récolte. B) Ellipse de confiance autour des catégories de pourcentage de germination, calculé sur les pourcentages de germination maximale observée à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 373 lots de graines de ray-grass anglais. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Les ellipses de confiance montrent que l'axe 1, est positivement corrélé avec l'année de récolte (**Figure 2.3A**). « Le déplacement de droite à gauche sur l'axe 1 représente une diminution du pourcentage de germination maximale avec l'augmentation de l'âge des graines ». Il montre également qu'il n'y a pas de grande variabilité entre les lots de graines dans le pourcentage de germination maximale pour des périodes de stockage allant jusqu'à dix ans. En effet, lorsque les lots sont identifiés pour leur germination maximale dans des intervalles de 10 %, il ressort une claire distribution le long de l'axe 1. La **figure 2.3B** montre que le pourcentage de germination est positivement corrélé avec l'axe 1. « Le déplacement de droite à gauche sur cet axe représente une diminution du pourcentage de germination maximale ». La **figure 2.3B** montre également qu'il n'y a pas de grandes différences entre les lots de graines dans le pourcentage de germination pendant les périodes de stockage allant jusqu'à dix ans.

On déduit de cette analyse que le pourcentage de germination des lots analysés est corrélé à l'âge des graines. En plus, ces lots ne répondent de la même façon à la température.

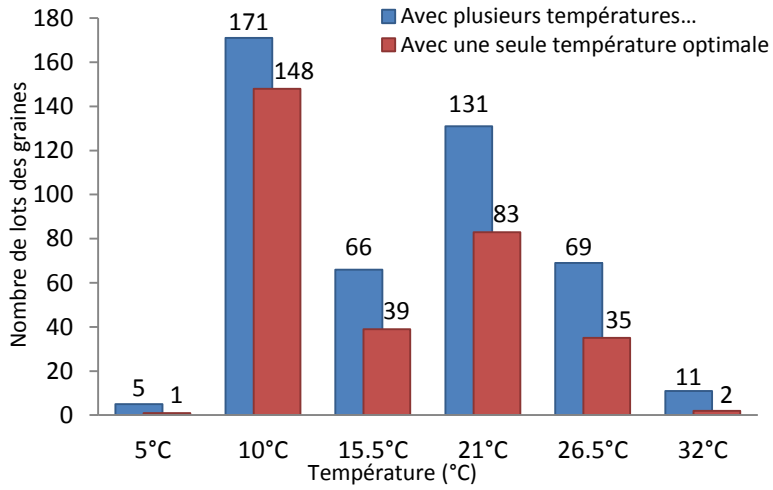


Figure 2. 4 : Nombre de lots de graines de ray-grass qui atteignent un pourcentage de germination maximale pour chaque température.

La **figure 2.4** montre qu'il y a une forte variabilité entre les lots de graines de ray-grass au niveau de la température optimale, celle qui permet d'obtenir le pourcentage de germination maximale. La température de 10 °C a été le traitement le plus fréquemment observé comme température optimale. C'était le cas pour 148 lots montrant une seule température optimale et dans 171 lots montrant plusieurs températures optimales (une plage des températures). Le traitement à 10 °C est suivi par le traitement à 21 °C, qui est la

température optimale pour 83 lots montrant une seule température optimale et pour 131 lots montrant plusieurs températures optimales. Par contre, les températures de 5 et 32 °C ont été les traitements les moins fréquemment observés comme température optimale. La **figure 2.4** montre également qu'il n'y a pas de grandes différences dans les fréquences des températures optimales entre les températures 15,5 et 26,5 °C.

Des fortes variabilités en réponse à la température ont été observées entre les lots de graines. La **figure 2.5** met en évidence que 74 % des lots ont un pourcentage de germination maximale entre 80 à 100 %, ce qui représente 275 de 373 lots. De plus, 98 lots ont leur pourcentage de germination maximale inférieur à 80 %. Il y a eu 30 lots de graines avec des pourcentages de germination maximale inférieure à 40 %.

Cette variation dans le pourcentage de germination maximale peut être due à des facteurs génétiques et non génétiques (p. ex.: lieu, périodes de stockage et méthode de stockage). Les lots de graines qui ont été utilisés dans cette recherche proviennent de diverses sources et de différentes périodes de stockage (différentes années de récolte). Nous évaluerons ce facteur par la suite (chapitre III).

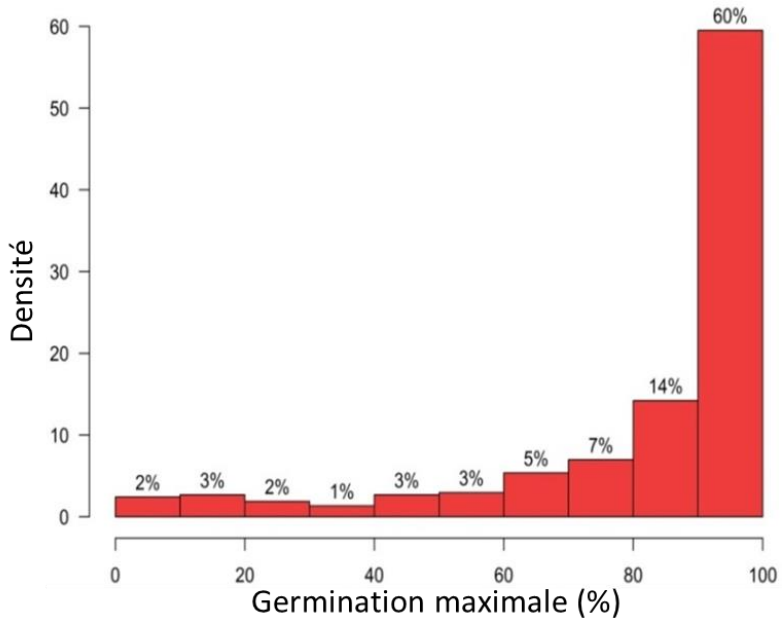


Figure 2.5 : Densité de pourcentage de germination maximale de différents lots de graines de ray-grass anglais.

Dans cette analyse, pour réduire l'impact des facteurs non génétiques sur la capacité germinative des lots de graines, nous avons décidé de relancer les analyses d'ACP et HCPC, uniquement pour les lots de graines dont le pourcentage de germination maximale était supérieur à 40 %, ce qui représente 342 des 373 lots de graines de ray-grass initialement analysés.

La variabilité entre les 342 lots de ray-grass a été illustrée par une ACP calculée avec leur réponse à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) (**Figure 2.6**). Les deux premiers axes représentent 95 % de la variation. L'axe 1, avec 80 % de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures, mais surtout aux traitements 5,5 et 21 °C. L'axe 2, qui correspond à 15 % de la variance totale, a été positivement lié aux traitements de 5, 10 et 15,5 °C et négativement corrélé aux traitements de 21; 26,5 et 32 °C (**Figure 2.6A**). La **figure 2. 6B** montre que les lots de graines de ray-grass sont distribués sur l'ensemble du diagramme. On déduit de cette analyse qu'il y a toujours une variabilité en réponse à la température entre les lots de graines de ray-grass même si des lots ont été écartés des analyses à cause d'une trop faible capacité de germination (<40%), qu'elle soit due à l'âge de lot ou aux conditions de conservation.

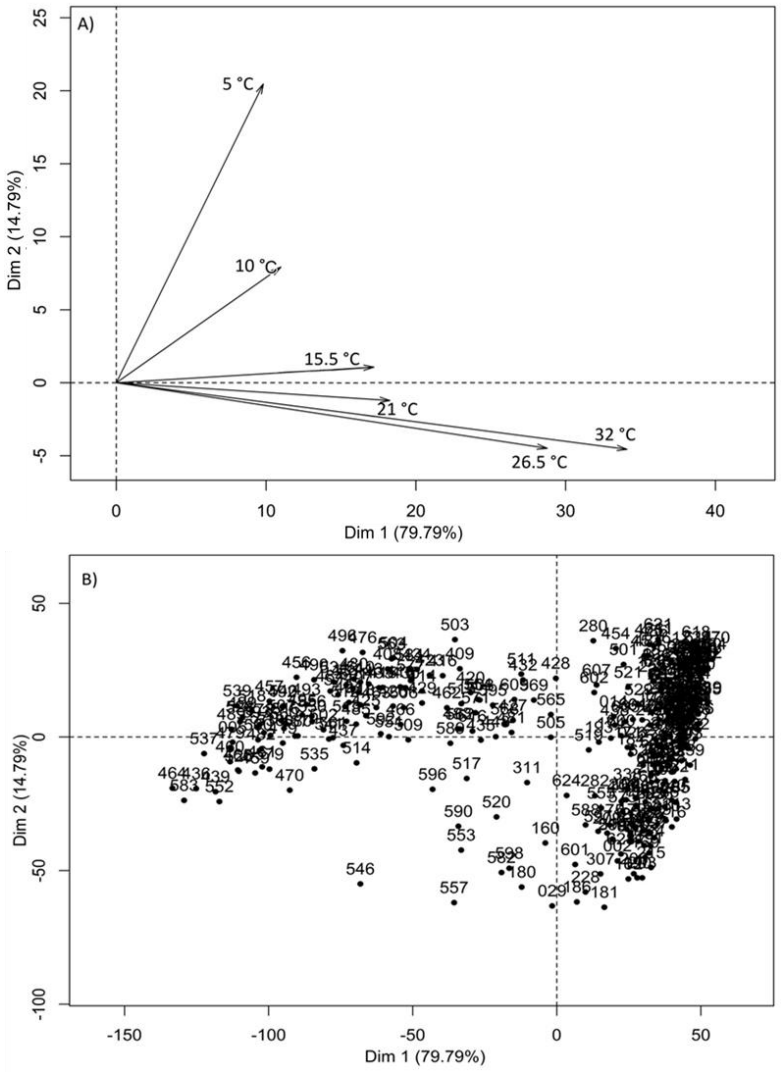


Figure 2.6**:** Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur les pourcentages de germination observés (supérieur à 40 %) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 342 lots de graines de ray-grass anglais. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Afin de classer les lots de graines en fonction de leur réponse à la température, un HCPC a été relancé. Cette HCPC a classé les 342 lots de graines de ray-grass en quatre groupes (**Figure 2.7**). Cette classification était basée sur le pourcentage de germination maximale de chaque lot qui était corrélé positivement avec l'axe 1, et le pourcentage de germination à chaque température qui était corrélé avec l'axe 2, comme le montre la **figure 2.6A**. Ainsi, chaque groupe représente un type de courbes de réponse aux températures.

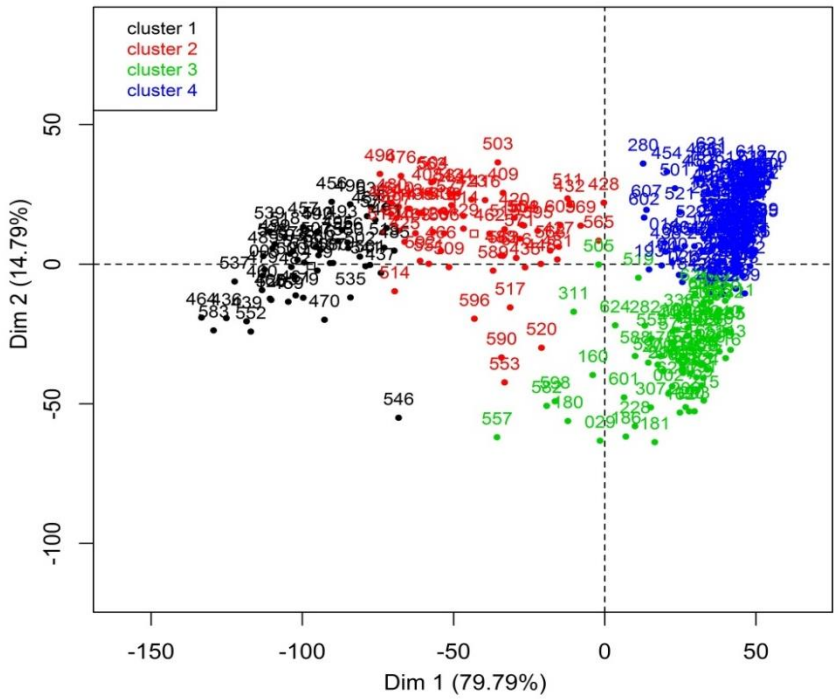


Figure 2.7**:** Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composants principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composants principales (HCPC), calculée sur les pourcentages de germination observés (supérieur à 40 %) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 342 lots de graines de ray-grass anglais**.** Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Les lots dans le groupe I ont un pourcentage de germination maximale entre 40 et 86 %, relativement moindre à celui des autres groupes. Les courbes de réponse à la température de ce groupe ont montré que le pourcentage de germination augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminue fortement avec l'augmentation de la température. La température optimale a été à 10 °C dans la majorité des lots de ce groupe (**Figure 2.8**). De plus, les lots dans ce groupe ont une faible capacité germinative à 26,5 et 32 °C par comparaison aux groupes III et IV.

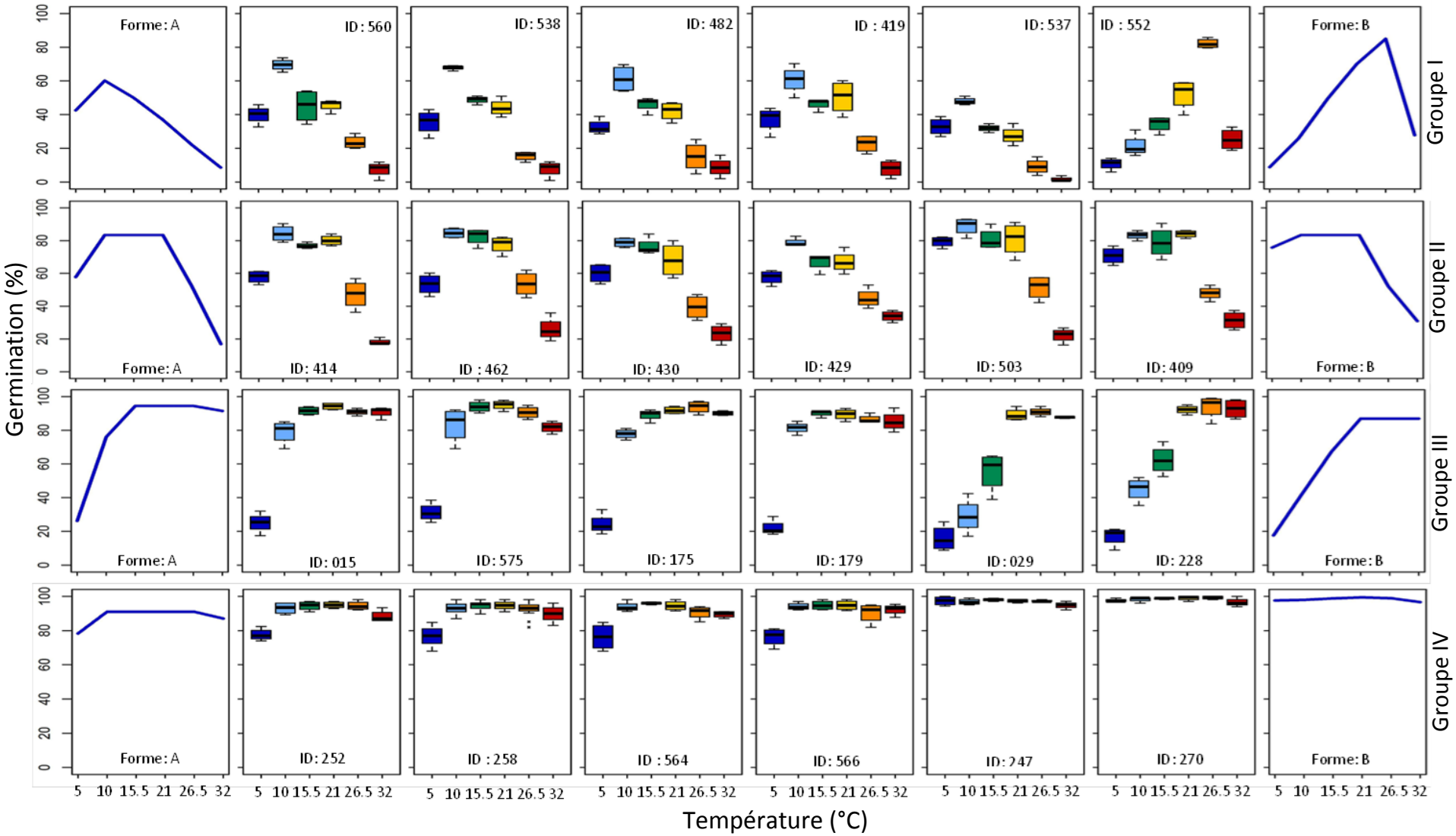


Figure 2. 8 : Parangons et exemples (première et dernière colonnes) de lots de ray-grass anglais montrant différentes formes de courbes de réponse germinative à la température (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C). Les formes des courbes correspondent au groupe identifié par l'analyse HCPC

Dans le groupe II, les courbes de réponse à la température ont montré que le pourcentage de germination augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale de 10 °C et reste constant jusqu'à 21 °C, puis diminue avec l'augmentation de la température. Ainsi, les lots dans ce groupe ont une faible capacité germinative à 26,5 et 32 °C, par comparaison aux groupes III et IV (voir ci-après). Les lots dans ce groupe II ont un pourcentage de germination maximale relativement supérieur à celui du groupe I (**Figure 2.8**).

Les lots dans le groupe III ont un pourcentage de germination maximale supérieure à 80 %. Toutefois, d'une manière générale, les lots dans ce groupe ont montré une faible capacité germinative à 5 °C. Les courbes de réponse à la température de ce groupe ont montré que le pourcentage de germination augmente fortement avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis reste constant jusqu'à 32 °C dans la plupart des cas (**Figure 2.8**). Ce groupe contient 79 lots de graines de ray-grass en provenance de récoltes ou multiplications dans la période des années 1992 à 2015.

Dans le groupe IV, les lots ont une forte capacité germinative pour tous les traitements mais dans certains cas la capacité germinative à 5 °C est plus basse que pour les autres traitements (**Figure 2.8**). Ce groupe contient 148 lots de graines de ray-grass récoltés ou multipliés de 1994 à 2015.

Les différents types de courbes de réponse aux températures, qui ont été observés entre les groupes (**Figure 2.8**), reflètent la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Lolium perenne* L.

La **figure 2.9** montre qu'il n'y a pas de corrélation claire entre les groupes de type de germination et l'origine géographique des lots dans ces groupes. Cela peut être logique parce que l'analyse HCPC a classé les lots de graines en quatre groupes, en prenant en considération les pourcentages de germination dans tous les traitements. De plus, la **figure 2.6** montre que le pourcentage de germination maximale observée de chaque lot à n'importe quelle température a été distingué en fonction de l'axe 1, qui représente un total de 80 % de la variance totale.

La **figure 2.9** montre aussi que les lots de graines des groupes I et II sont distribués spécifiquement dans différentes régions de France. Les ellipses de confiance dans une analyse ACP montrent que ce phénomène est dû au grand nombre de lots de graines provenant du CRB qui sont âgées de plus de dix ans (**Figure 2.10**).

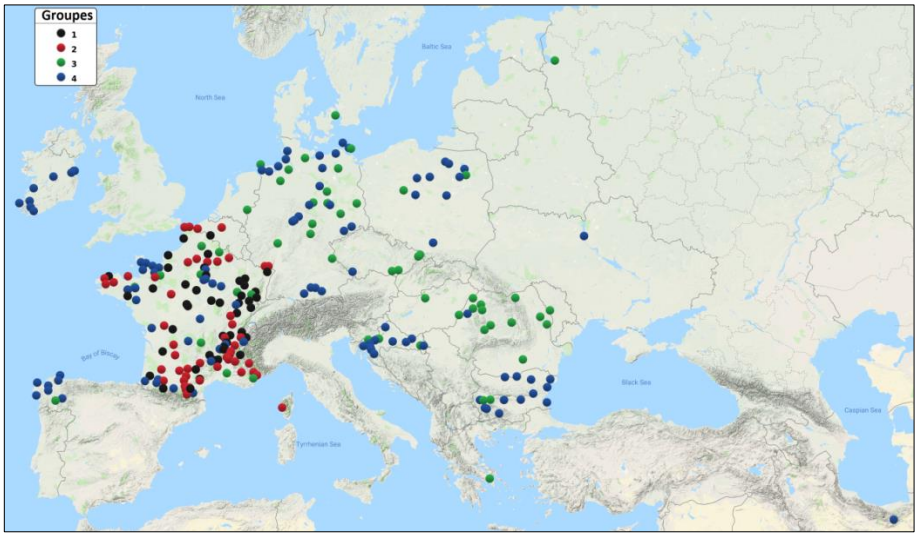


Figure 2.9: Sites de collecte de lots de graines sauvage de ray-grass anglais, chaque couleur représente un groupe formé avec la méthode HCPC sur les pourcentages de germination observés au six températures étudiées.

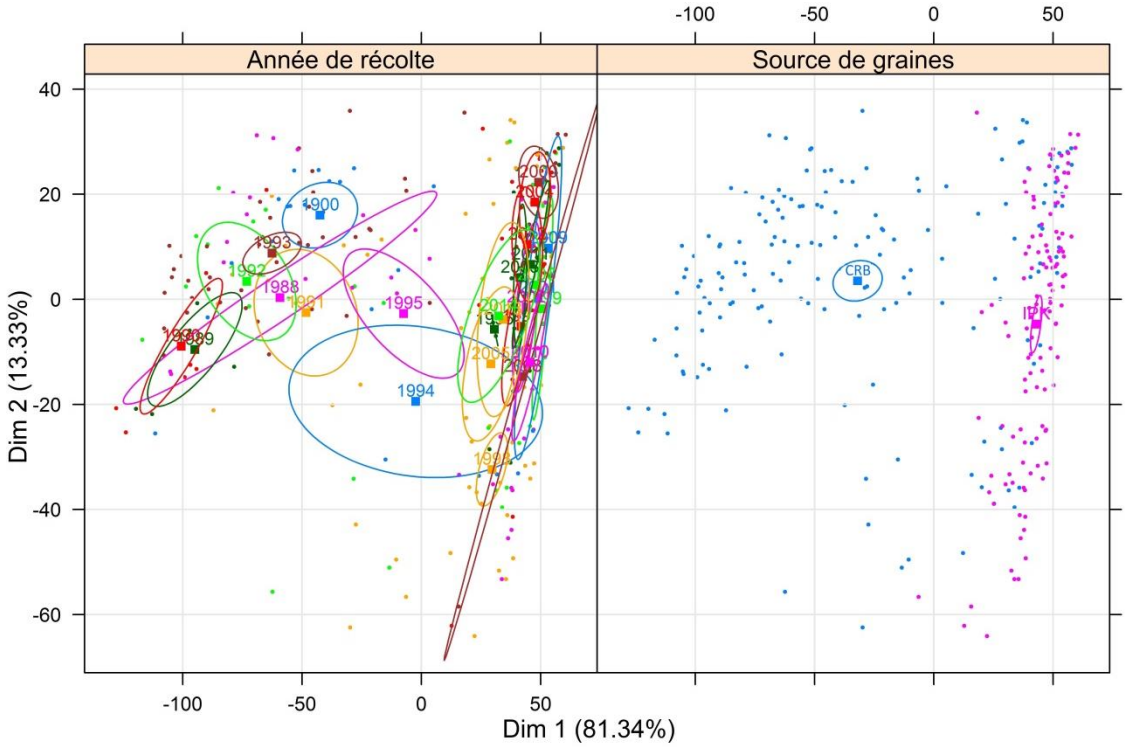


Figure 2. 10: Ellipse de confiance autour des catégories de l'année de récolte et la source de graines (CRB et IPK). Calculée sur les pourcentages de germination maximale observée à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de lots de graines sauvage de ray-grass.

On a vu précédemment que les lots appartenant aux groupes I et II ont des réponses germinatives à la température très marquées. En particulier la germination à 5 et 32 °C est beaucoup plus basse que la germination observée à la température optimale. Donc, dans la recherche des liens entre la réponse germinative et le lieu de provenance, nous avons étudié

la relation entre le pourcentage de germination à 5 °C et 32 °C et le nombre de jours avec une température maximale de l'air inférieure à 0 °C au cours des deux dernières semaines de l'année. Plus cette dernière variable climatique est forte, plus l'hiver est froid. La **figure 2.11** montre qu'il 'y a une relation significative entre ces deux variables. Comme prévu, on observe que plus la population vient d'un endroit froid moins elle germe bien à 5 °C, et inversement mieux elle germe à 32 °C.

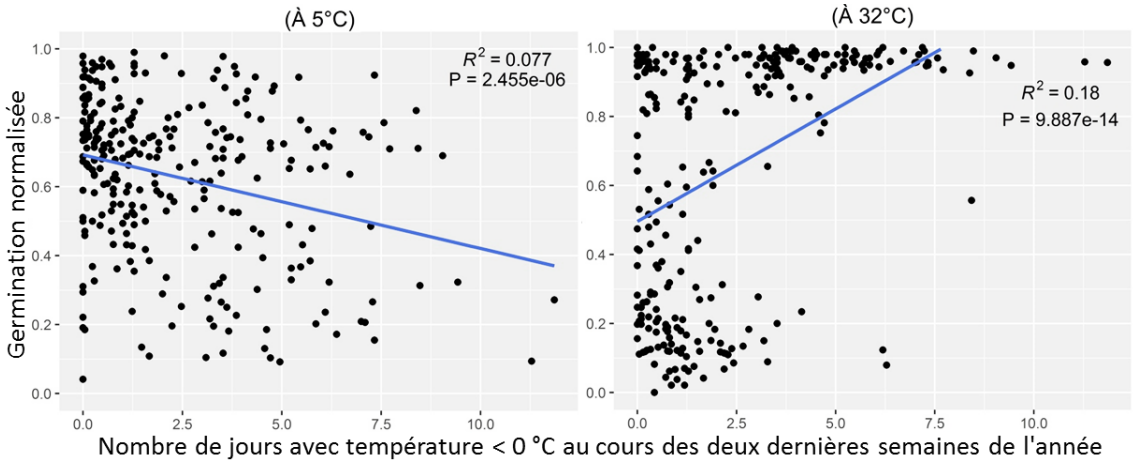


Figure 2.11: la relation entre le pourcentage de germination normalisée et le nombre de jours avec température maximale de l'air inférieure à 0 °C au cours des deux dernières semaines de l'année (moyenne sur la période 1989-2010) à 5 et 32 °C de lots de graines sauvage de ray-grass.

3.1.2. Effets de la température sur la vitesse de germination

Dans cette analyse, 326 lots de ray-grass anglais ont été évalués, plusieurs paramètres qui relient la germination au temps ont été calculés: le temps de début de germination (*tc*), la vitesse maximale de germination (*a*) et le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$).

3.1.2.1. Temps initial apparent de germination (*tc*)

Afin de comparer l'effet de la température sur le temps initial apparent de germination (*tc*) entre les lots de graines de ray-grass, une ACP a été réalisée sur de valeurs estimées de *tc* calculées à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5; 32 °C) (**Figure 2.12**). L'axe 1, qui représente un total de 98 % de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures, notamment au traitement 5 °C. L'axe 2, qui correspond à moins de 2 % de la variance totale, a été négativement corrélé au traitement à 5 °C mais positivement corrélé aux autres traitements. Les valeurs de *tc* maximale de chaque lot ont été principalement distinguées en fonction de l'axe 1.

L'analyse HCPC a classé les 326 lots de graines de ray-grass en trois groupes sur la base des valeurs estimées de temps initial apparent (*tc*) de chaque lot (**Figure 2.13**). Chaque groupe représente un type de courbes de réponse aux températures, en particulier à 5 °C.

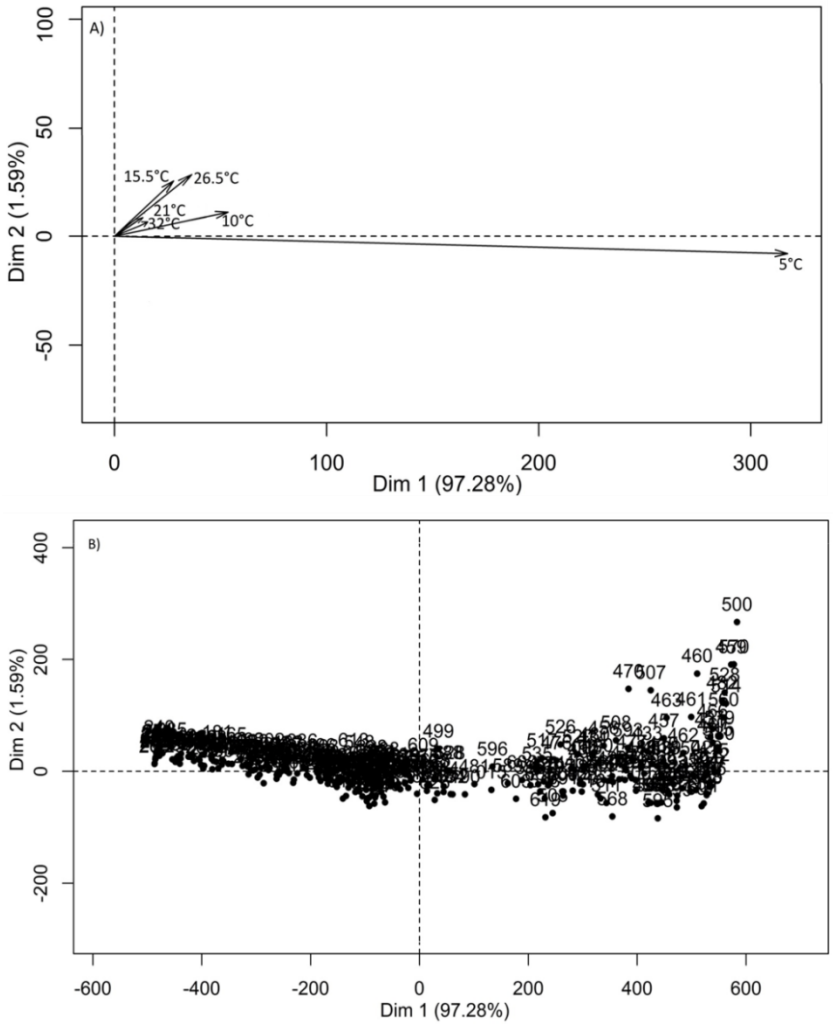


Figure 2. 12 : Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur le temps initial apparent estimés (*tc*) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

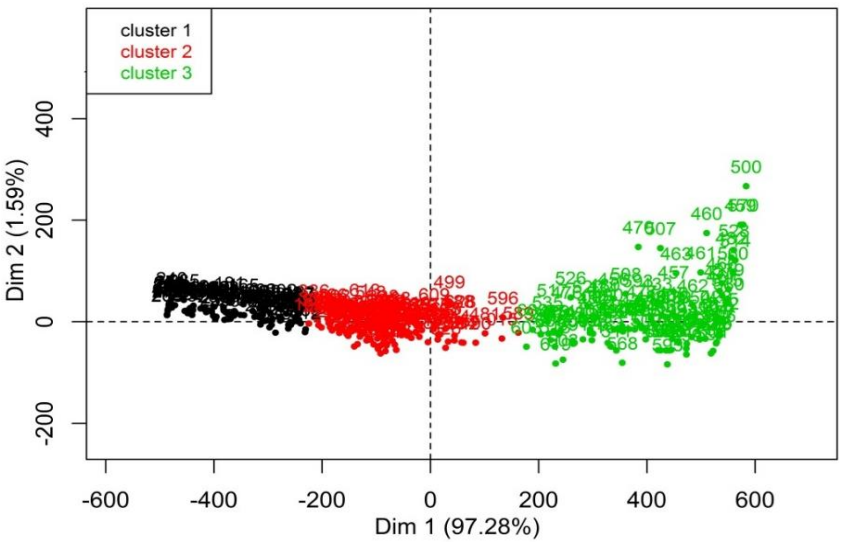


Figure 2. 13 : Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composants principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC), calculée sur le temps initial apparent estimé (*tc*) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Dans le groupe I, les lots ont une petite valeur estimée de *tc* en comparaison avec d'autres groupes, notamment le traitement de 5 °C (**Figure 2.14**). De plus, il n'y a pas de grandes différences de la valeur estimée de *tc* entre les températures de 10 °C jusqu'à 32 °C. Ce sont des lots qui germent très peu de temps après la mise en eau, y compris à 5 °C.

Les lots dans le groupe II ont une valeur estimée de *tc* inférieure à celui des groupes III et plus élevée que le groupe I. De plus, il n'y a pas de grandes différences de la valeur estimée de *tc* entre les températures de 10 °C jusqu'à 32 °C (**Figure 2.14**).

Dans le groupe III, les lots ont une forte valeur estimée de *tc* dans toutes les températures en comparaison avec des groupes I et II, surtout les traitements à 5 et 10 °C.

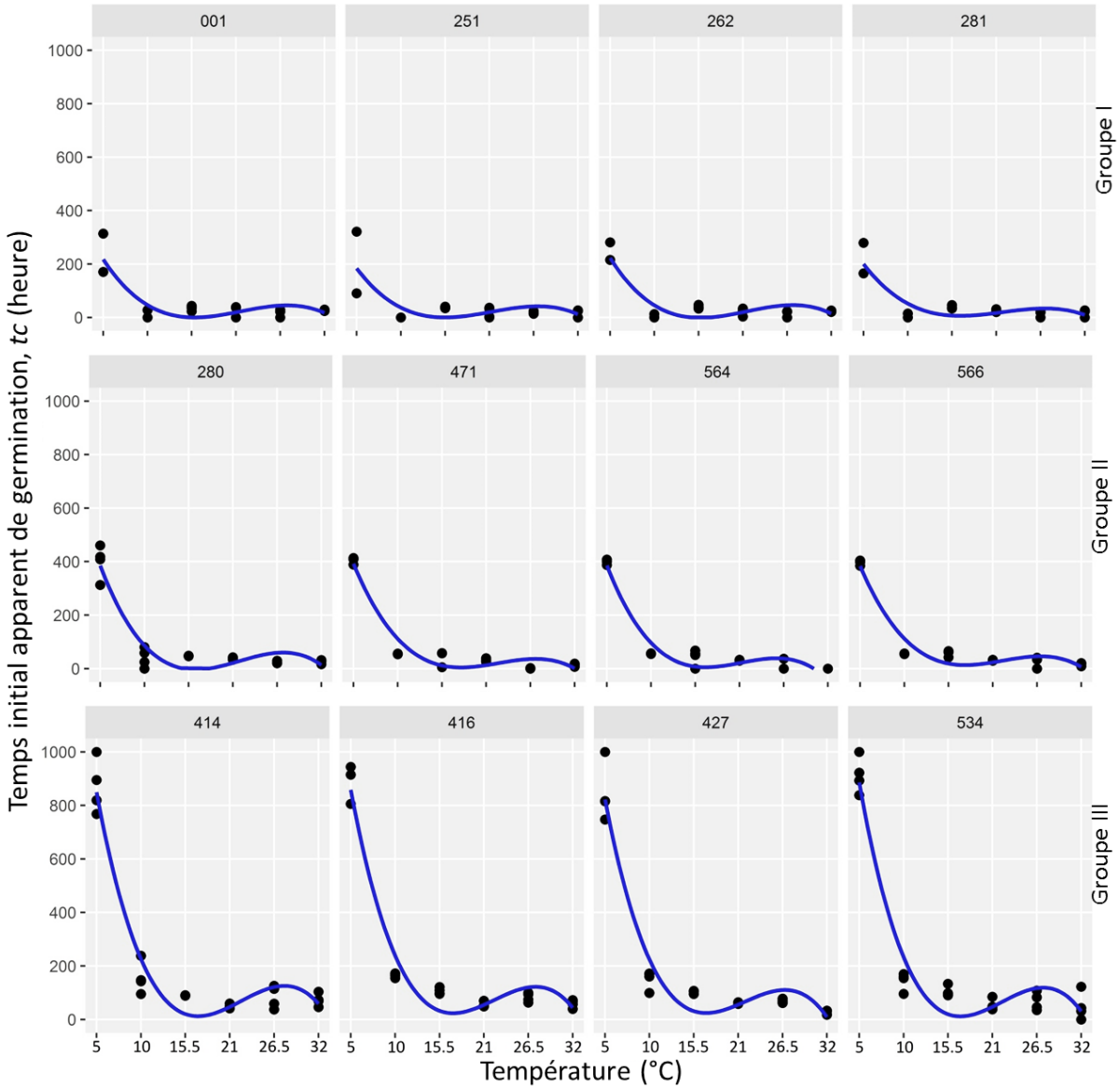


Figure 2. 14 : Exemples de parangons et de valeurs estimées du temps initial apparent de germination (*tc*) en fonction de la température de lots de graines de ray-grass anglais. Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponse germinative à la température (Groupes 1-3)

La **figure 2.15** montre qu'il n'y a pas de corrélation claire entre les groupes de type de courbes du temps initial apparent estimé (*tc*) et l'origine géographique des lots dans ces groupes. Cela peut être logique parce que le HCPC a classé les lots de graines en trois groupes, en prenant en considération les valeurs estimées de *tc* dans tous les traitements. De plus, la **figure 2.12** montre que la valeur estimée de *tc* de chaque lot à n'importe quelle température a été distinguée en fonction de l'axe 1, qui représente un total de 88 % de la variance totale.

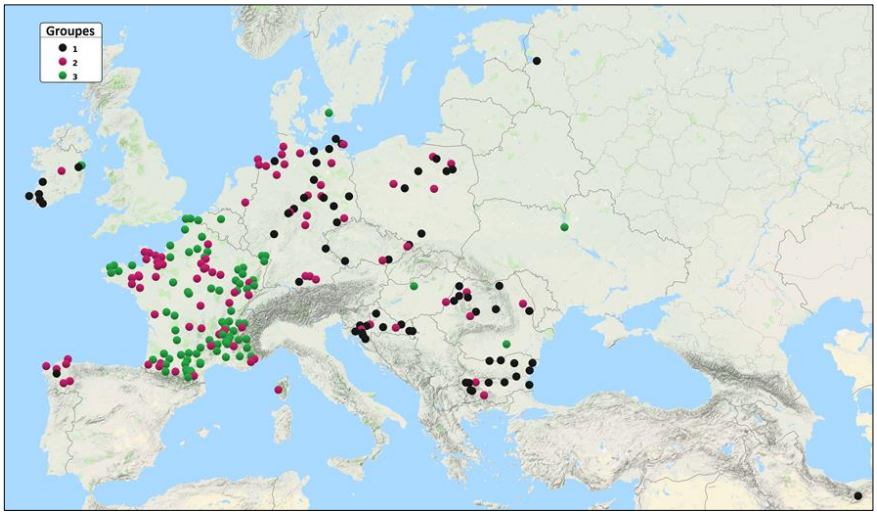


Figure 2.15 : Sites de collecte de lots de graines de ray-grass anglais naturelles, chaque couleur représente un groupe, calculée sur le temps initial apparent estimé (*tc*).

3.1.2.2. Vitesse maximale de germination (α)

Afin de comparer l'effet de la température sur la vitesse maximale de germination (α) entre les lots de graines de ray-grass anglais, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les valeurs estimées d'*α* à six températures (5; 10 ; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) (**Figure 2.16**). Les deux premiers axes représentent 90 % de variabilité des données. L'axe 1, qui représente un total de 78 % de variabilité, a été positivement corrélé à toutes les températures, notamment à 5 et 10 °C. L'axe 2, qui correspond à 13 % de la variance totale a été positivement corrélé aux traitements 5; 10; 21 et 32 °C et négativement corrélé aux traitements 15,5 et 26,5 °C. La **figure 2.16B** montrent que les lots de ray-grass ont été distribués sur l'ensemble du diagramme. La vitesse maximale de germination de chaque lot a été distinguée en fonction de l'axe 1, et la vitesse de germination des traitements dans chaque lot ont été distingués en fonction de l'axe 2.

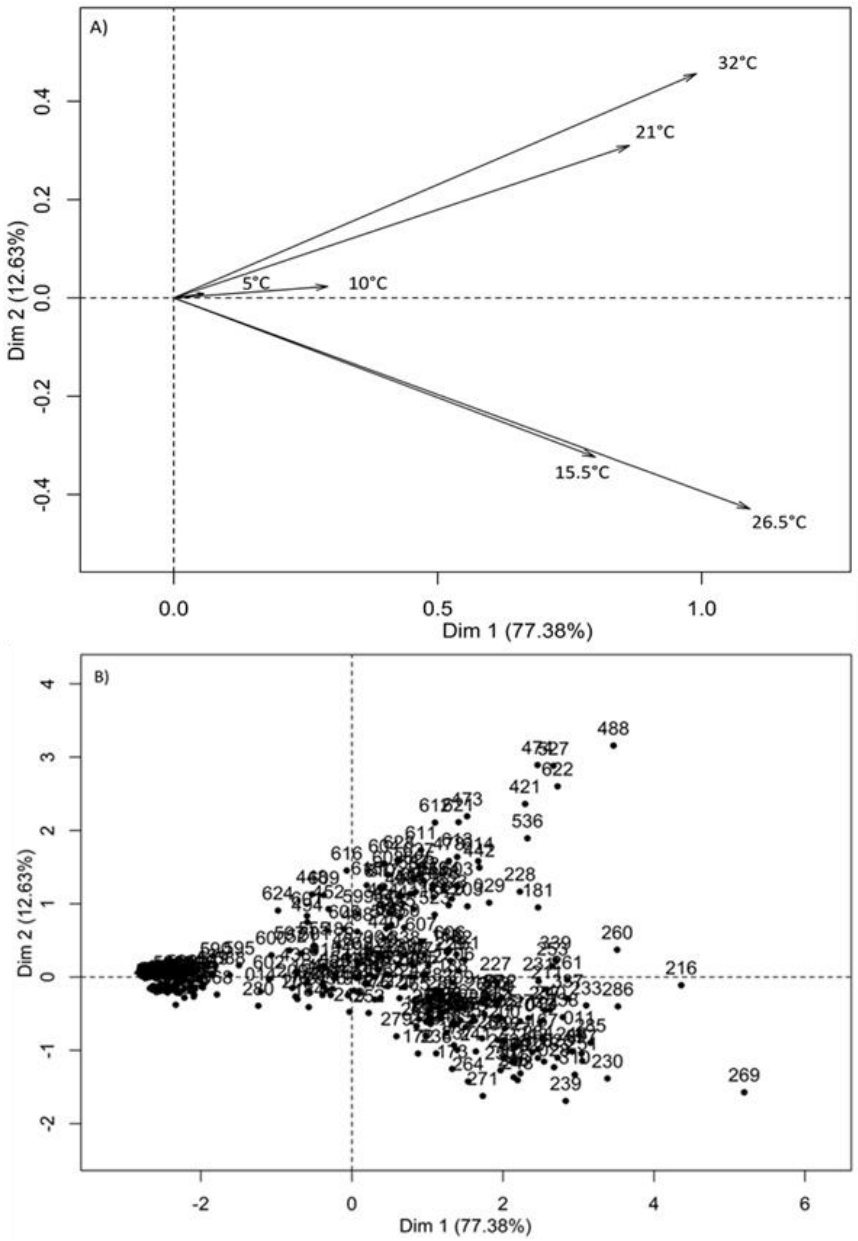


Figure 2. 16 **:** Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur la vitesse maximale de germination estimée (α) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais**.** A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Afin de classer les lots de graines en fonction de leur vitesse maximale de germination (α) en réponse aux températures, une HCPC a été réalisée. Cette HCPC a classé les 326 lots de graines en quatre groupes (**Figure 2.17**). Cette classification a été effectuée sur : i) la valeur maximale estimée d'α de chaque lot, indépendamment de la température à laquelle elle est obtenue, et ii) la valeur estimée d'α moyenne pour chacune des températures pour chaque lot. Chaque groupe représente un type de réponse à la température en terme de vitesse maximale de germination (α).

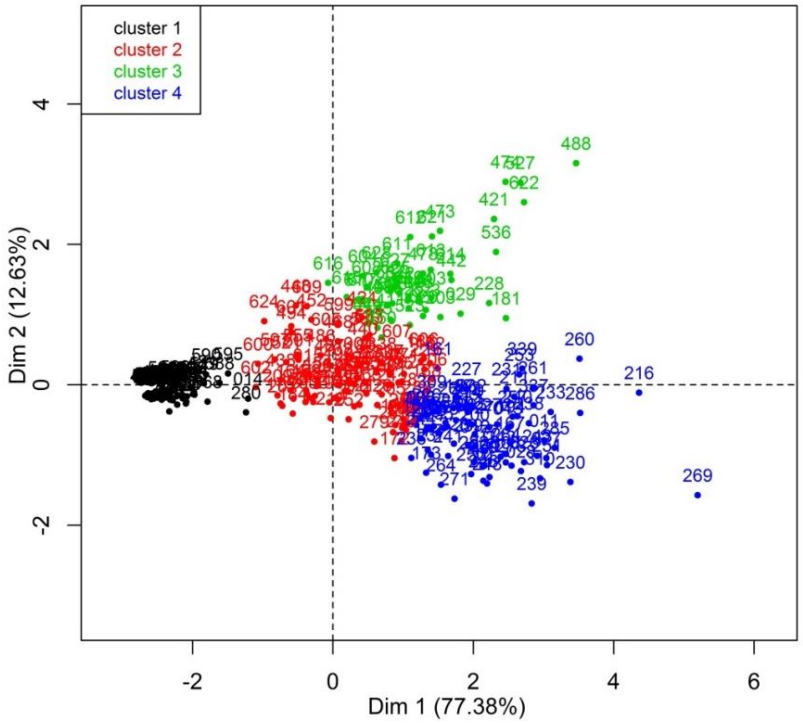


Figure 2. 17: Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composants principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composants principales (HCPC), calculée sur la vitesse maximale de germination estimée (α) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Les lots dans le groupe I ont une vitesse maximale de germination estimée (α) beaucoup moins rapide à celui des autres groupes. Les courbes de valeurs estimées d'α ont montré que α augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminue fortement avec l'augmentation de la température. La température optimale a été d'environ 15,5 °C dans la majorité des lots de ce groupe. De plus, les lots dans ce groupe ont une vitesse de germination très lente à 5 et 32 °C en comparaison à d'autres températures (**Figure 2.18**).

Dans le groupe II, les courbes de valeurs estimées α ont montré une augmentation avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale (entre 21 et 26,5 °C), puis diminue avec l'augmentation de la température (**Figure 2.18**). Les lots dans ce groupe ont une vitesse de germinations estimées (α) plus rapide que celui du groupe I. De plus, les lots dans ce groupe ont une vitesse de germination moins rapide à 5 °C en comparaison à d'autres températures.

Dans le groupe III, les courbes de valeurs estimées α ont montré que les vitesses de germination augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température

optimale (entre 10 et 15,5 °C) et reste constant jusqu'à 26.5 °C, puis diminuent avec l'augmentation de la température (**Figure 2.18**).

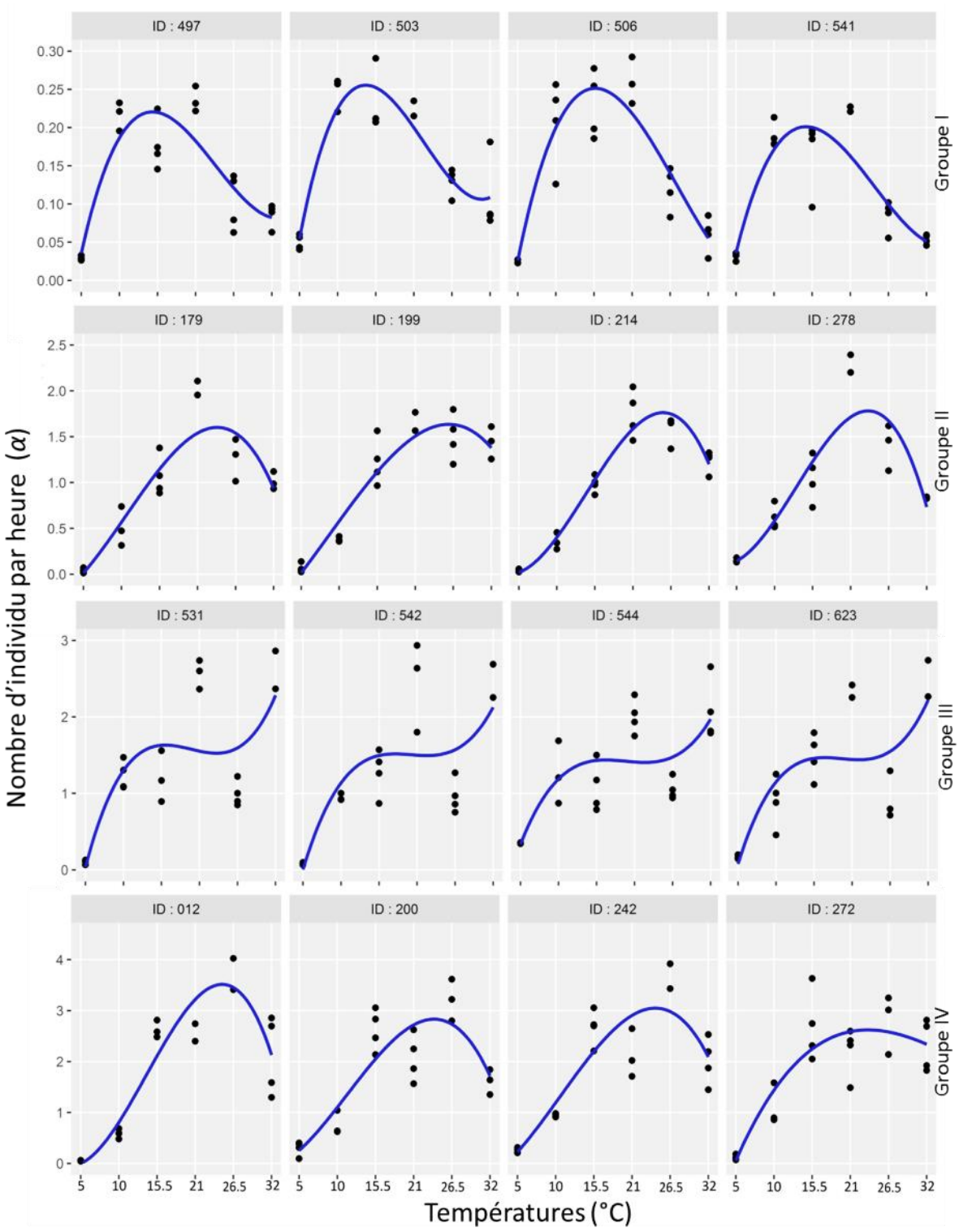


Figure 2.18 : Exemples de parangons et de valeurs estimées de la vitesse maximale de germination (α) en fonction de la température de lots de graines de ray-grass anglais, Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponses germinatives à la température (Groupes 1-3)

Les lots dans le groupe IV ont une vitesse de germination estimée (α) plus elevée à toutes les températures par comparaison à d'autres groupes. Les courbes de valeurs estimées α ont montré que les vitesses de germination augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale (entre 21 et 26,6 °C), puis diminue un peu avec l'augmentation de la température (**Figure 2.18**).

Les différents types de courbes de la vitesse maximale de germination (α) en réponse à la température, qui ont été observés entre les groupes (**Figure 2.18**), reflètent la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Lolium perenne* L.

1.1.1.1. Temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$)

La variation entre les lots de ray-grass anglais a été illustrée par une ACP calculée sur le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5; 32) (**Figure 2.19**). Les deux premiers axes expriment un total de 97,35 % de variabilité des données. L'axe 1, qui explique 90,71 % de la variation, a été positivement corrélé à toutes les températures. L'axe 2, qui montre 6,64 % de la variance totale, a été positivement corrélé à toutes les températures, sauf au traitement 5 °C où il a été négativement corrélés. Les lots de ray-grass ont été distribués sur tout le diagramme. Le $t_{95\%}$ de chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 1, et le $t_{95\%}$ de chaque traitement dans chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 2 (**Figure 2.19B**). On déduit de cette analyse qu'il y avait une forte variabilité dans le temps requis pour atteindre 95 % de la germination finale entre les lots de graines du ray-grass en réponse aux températures.

Ensuite, l'analyse HCPC a classé les 326 lots de graines du ray-grass en quatre groupes (**Figure 2.20**). Cette classification était basée sur le $t_{95\%}$ en réponse aux températures. Chaque groupe présente un type de l'effet des températures sur le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale.

La **figure 2.21** montre que les courbes de valeurs estimées $t_{95\%}$ dans tous les groupes ont presque la même forme. De plus, elles ont montré que $t_{95\%}$ diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis reste constant jusqu'à 26,5 °C, ensuite diminue légèrement à 32 °C dans certains cas. (**Figure 2.21**). Généralement, $t_{95\%}$ est le plus élevé à 5 °C.

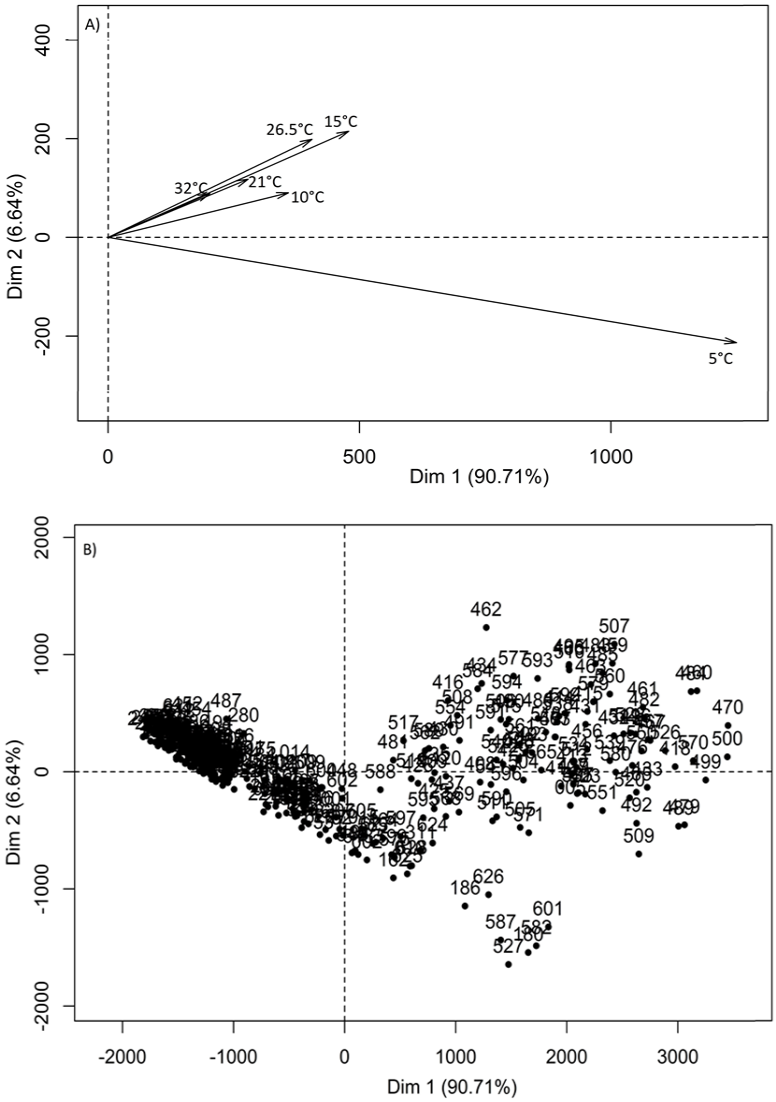


Figure 2.19 : Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur le temps à 95 % de germination finale estimé ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

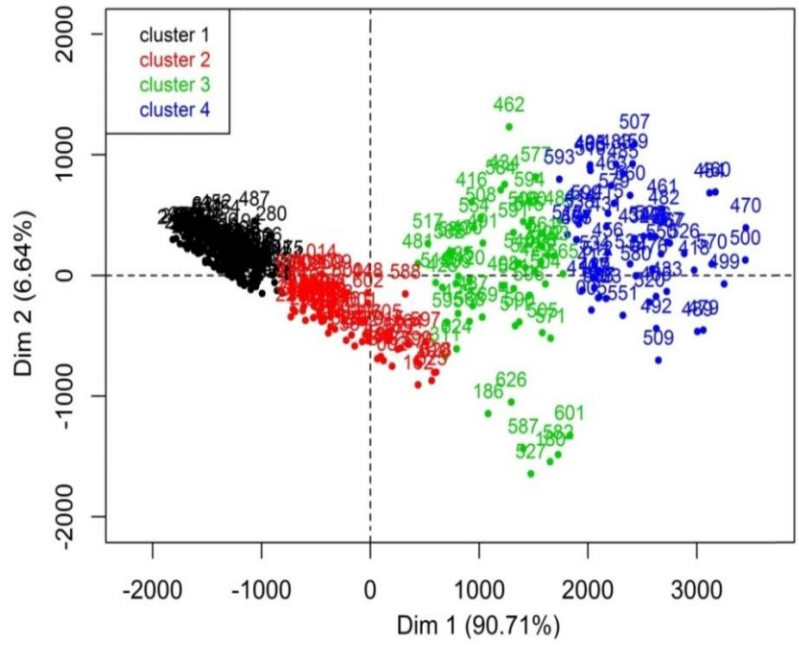


Figure 2.20: Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composants principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composants principales (HCPC), calculée sur le temps à 95 % de germination finale estimé ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

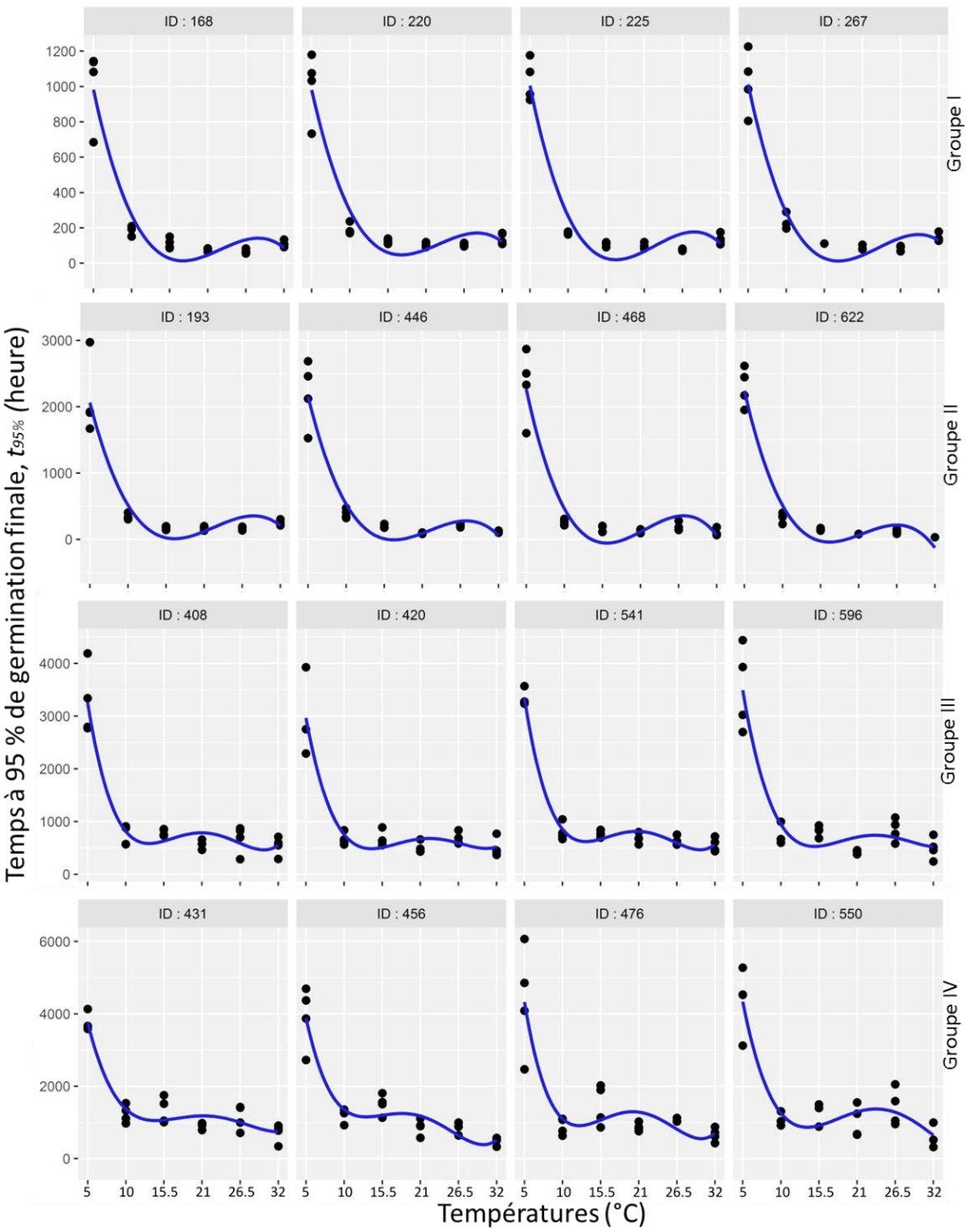


Figure 2.21: Exemples de parangons et de valeurs estimées du temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) en fonction de la température de lots de graines de ray-grass anglais. Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponses germinatives à la température (Groupes 1-4)

Dans le groupe I, les lots ont une petite valeur estimée de $t_{95\%}$ en comparaison avec d'autres groupes. (**Figure 2.21**). En général, les lots dans ce groupe requièrent moins de

temps pour atteindre 95 % de la germination finale que les autres groupes, notamment à 5 °C.

Les lots dans le groupe II ont un $t_{95\%}$ inférieur à celui des groupes III et IV mais plus élevé que le groupe I. De plus, il n'y a pas de grandes différences en valeur estimée de $t_{95\%}$ entre les températures de 10 °C jusqu'à 32 °C (**Figure 2.21**).

Dans le groupe III, les lots ont une grande valeur estimée de $t_{95\%}$ dans toutes les températures en comparaison avec des groupes I et II en particulier à 5 °C (**Figure 2.21**).

Les lots dans groupe IV ont des valeurs estimées de $t_{95\%}$ plus élevées à toutes les températures en comparaison avec les autres groupes (**Figure 2.21**).

3.1.2.3. Relation entre le temps initial apparent et le temps à 95 % de germination finale

Les réponses germinatives aux températures constantes étaient significativement différentes à l'intérieur et entre les lots pour ces deux paramètres. En général, les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ ont diminué lorsque la température a augmenté de 5 à 10 ou 15,5 °C, puis sont restée constante ou ont augmenté un petit peu avec l'augmentation de la température.

Nous avons posé l'hypothèse qu'il existe une relation linéaire entre le temps initial apparent (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) en réponse à la température constante de 5 à 35 °C. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la relation entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ de chaque traitement pour 326 lots de ray-grass. Des régressions linéaires significatives ($P \leq 0,05$) ont été ajustées entre les deux variables (**Figure 2.22**). Il existe des relations significatives entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ pour toutes les températures testées

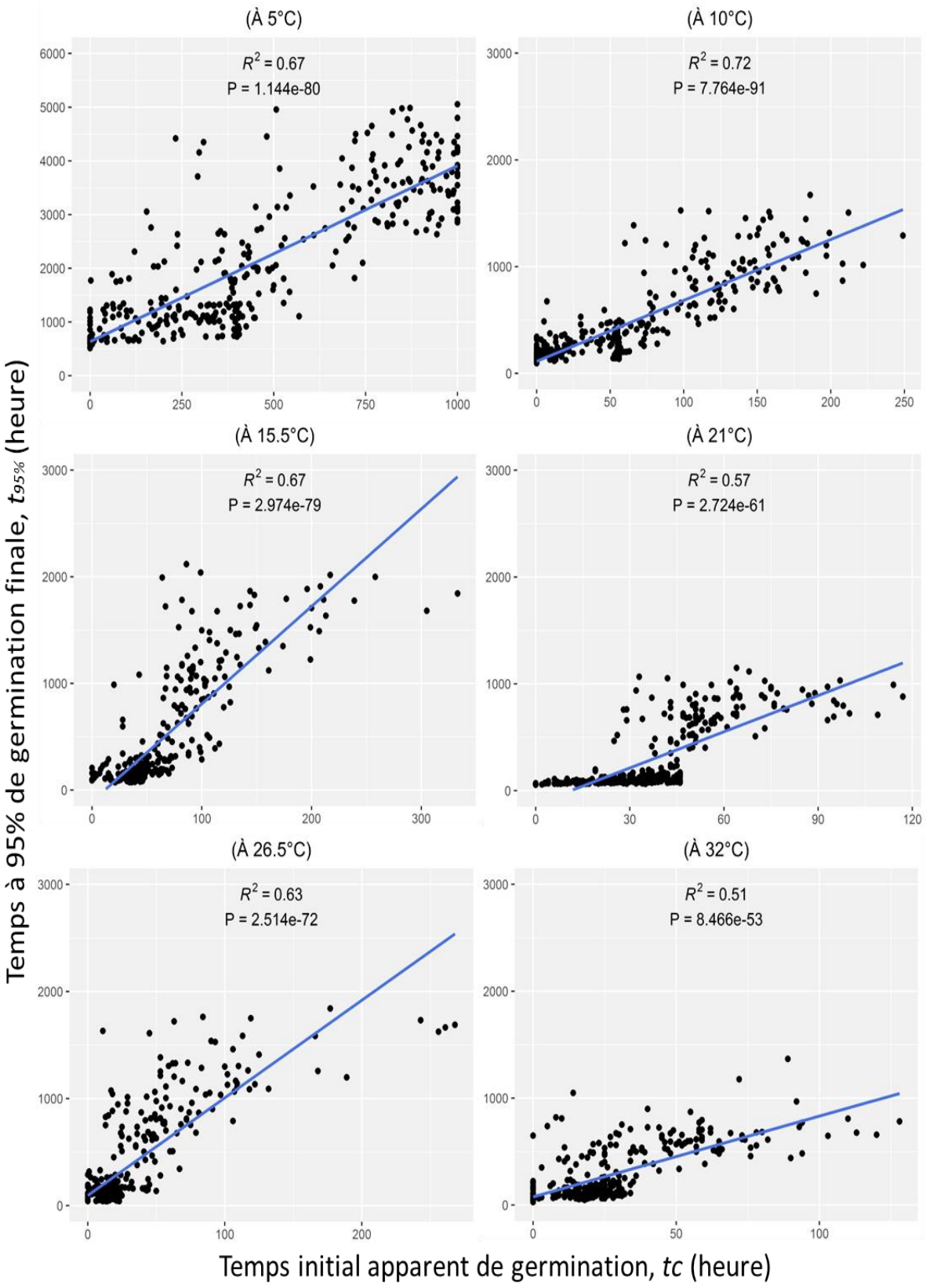


Figure 2.22: Relation le temps initial apparent (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 326 lots de graines de ray-grass anglais.

3.2. Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Festuca arundinacea* Schreb L.

3.2.1 Effets de la température sur le pourcentage de germination maximal

Pour la fétuque élevée, cent cinquante-huit lots ont été évalués. Les graines ont été obtenues de différentes sources et le test de germination a été faite selon six traitements (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C), comme décrit en détail dans le premier chapitre.

Des graphiques de type boîtes à moustaches ont été faits pour chaque ensemble des données de chaque lot en fonction de la température (Annexe 2.2). Ces graphiques montrent bien, qu'il existe une forte variabilité en réponse aux températures entre les lots de fétuque élevée et qui il y a une forte différence en pourcentage de germination entre les températures dans le même lot.

Dans certains cas, nous observons que le pourcentage de germination à 10 °C est moindre qu'à 5 °C et le reste des traitements. Afin de confirmer cette observation, nous avons relancé le traitement de 10 °C pour tous les lots de fétuque élevée. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les résultats du premier et du deuxième test à 10 °C. Cela confirme que ce phénomène est causé par des causes génétiques plutôt que par une erreur expérimentale.

Ensuite, la variation entre les lots de fétuque élevée ont été illustrée par une ACP réalisée sur l'ensemble de leur réponse aux températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5; 32 °C) (**Figure 2.23**). Les deux premiers axes représentent un total de 97 % de variabilité des données. L'axe 1 qui représente un total de 91 % de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures, notamment le traitement à 21 °C. L'axe 2, qui correspond à 6 % de la variance totale, a été positivement corrélé aux traitements 5; 10; 15,5 °C et négativement corrélé aux traitements de 21; 26,5; 32 °C (**Figure 2.23A**). Les lots de fétuque élevée ont été distribués sur l'ensemble du diagramme. Le pourcentage de germination maximale de chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 1, et le pourcentage de germination maximale des traitements dans chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 2 (**Figure 2.23B**). On déduit de cette analyse qu'il y avait une forte variabilité de la réponse aux températures entre les lots de graines.

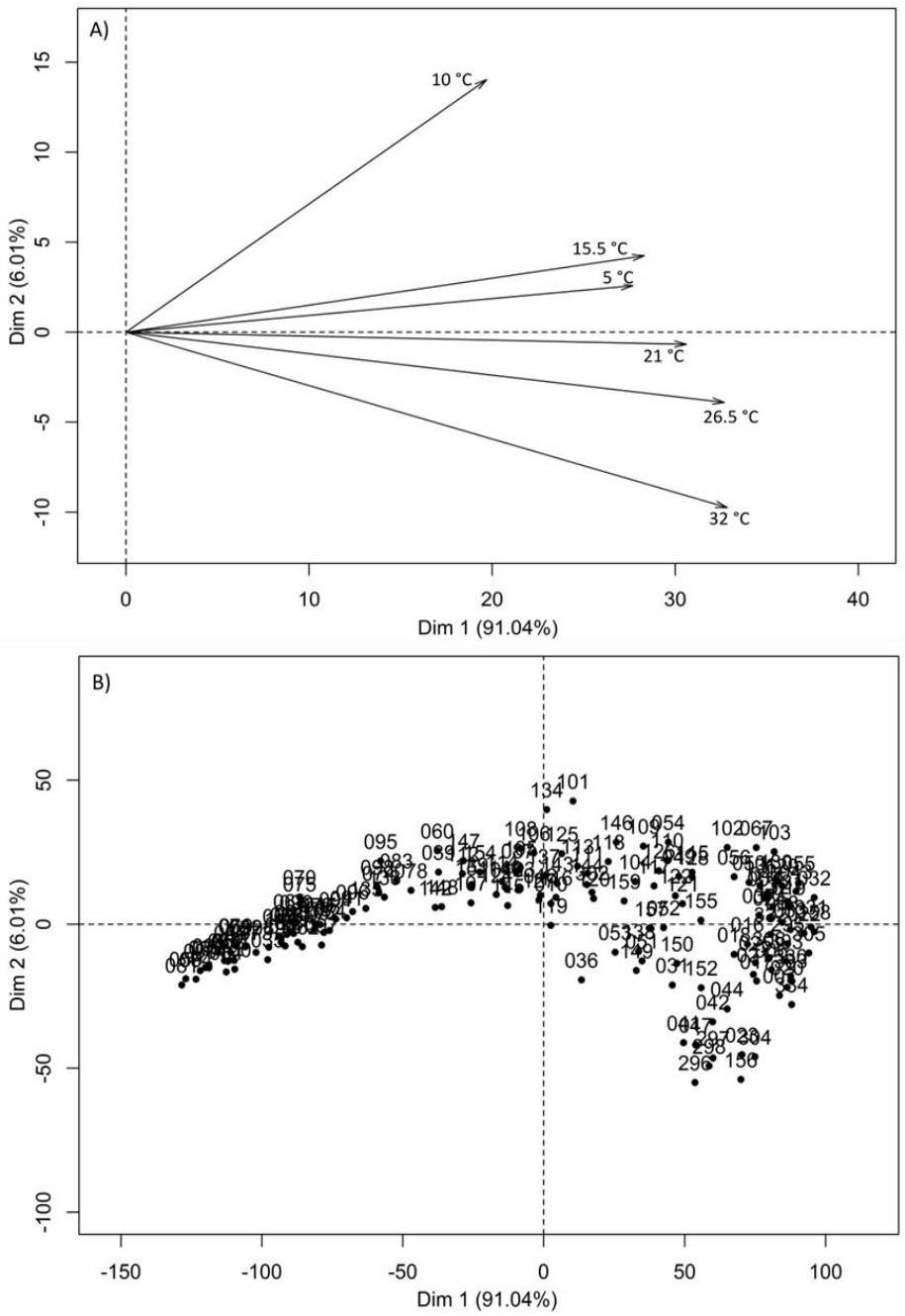


Figure 2.23: Analyse en composantes principales (ACP), calculée sur les pourcentages de germination observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 158 lots de graines de la fétuque élevée. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots de graines sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Ensuite, l'analyse HCPC a classé les 158 lots de graines de la fétuque élevée en cinq groupes (**Figure 2.24**), ces classifications ont été effectuées sur la base du pourcentage de germination maximal de chaque lot et le pourcentage moyen de germination à chacune des températures pour chaque lot.

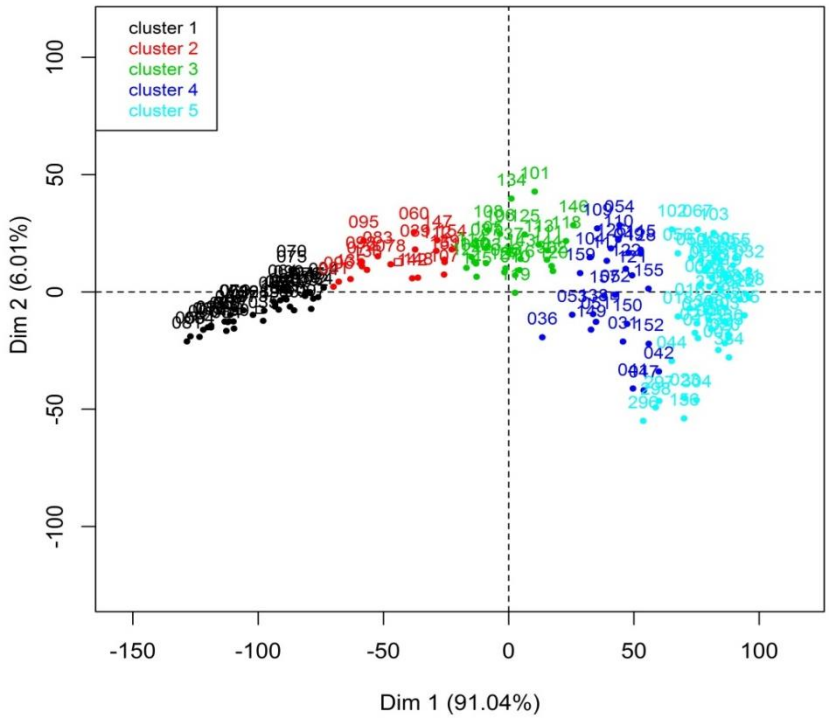


Figure 2.24**:** Classification des lots individuels sur la base de l'analyse des composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC). Calculée sur les pourcentages de germination observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 158 lots de graines de fétuque élevée**.** Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Les ellipses de confiance montrent que l'axe 1, est positivement corrélé avec l'année de récolte (**Figure 2.25A**). « Le déplacement de droite à gauche sur l'axe 1 représente une diminution du pourcentage de germination maximal avec l'augmentation de l'âge de graines ». Il montre également qu'il n'y a pas de grande variabilité entre les lots de graines dans le pourcentage de germination maximale pour des périodes de stockage allant jusqu'à dix ans. En effet, lorsque les lots sont identifiés pour leur germination maximale dans des intervalles de 10 %, il ressort une claire distribution le long de l'axe 1. La **figure 2.25B** montre que le pourcentage de germination maximal est positivement corrélé avec l'axe 1. « Le déplacement de droite à gauche sur cette axe représente une diminution du pourcentage de germination maximal ». La **figure 2.25B** montre également qu'il n'y a pas de grandes différences entre les lots de graines dans le pourcentage de germination pendant les périodes de stockage allant jusqu'à dix ans.

On déduit de cette analyse que le pourcentage de germination des lots analysés est corrélé à l'âge des graines. En plus, ces lots ne répondent de la même façon à la température.

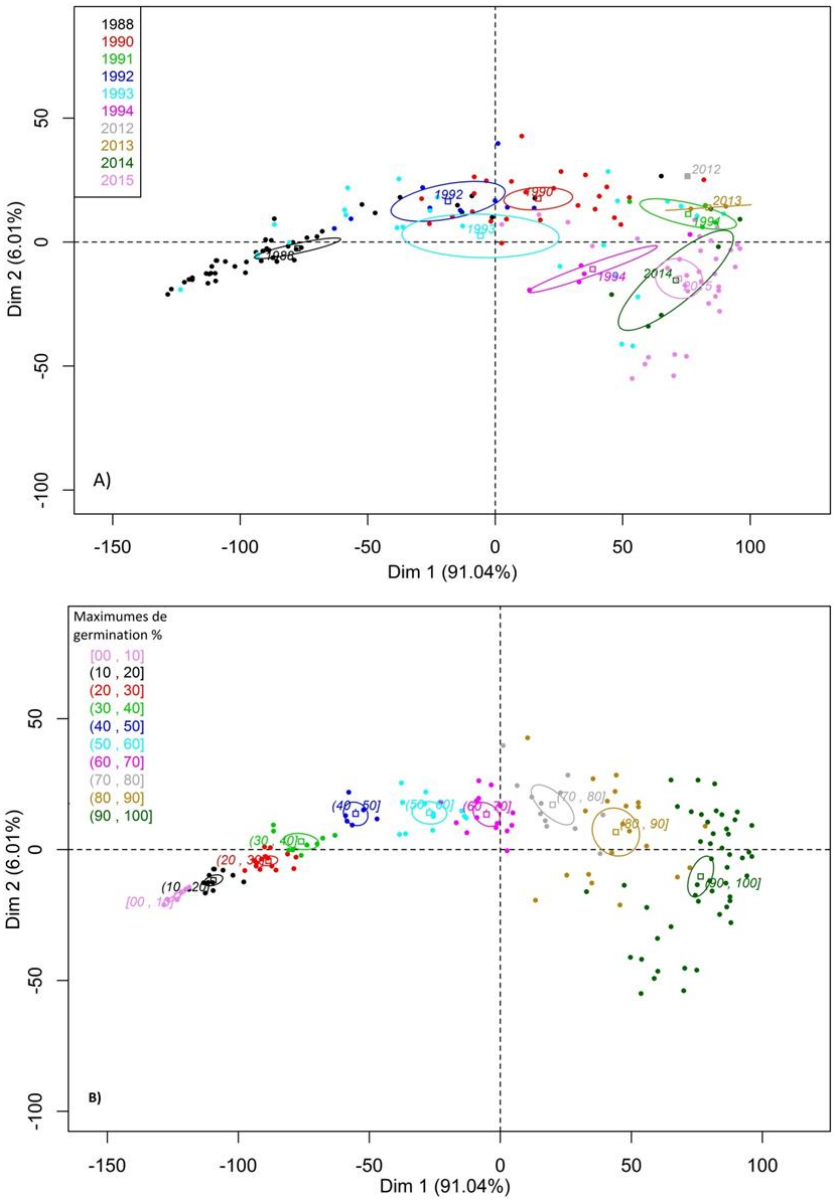


Figure 2.25: A) Ellipse de confiance autour des catégories de l'année de récolte. B) Ellipse de confiance autour des catégories du pourcentage de germination. Calculée sur les pourcentages de germination observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 158 lots de graines de fétuque élevée. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot

La **figure 2.26** montre qu'il y a une forte variabilité entre les lots de graines de fétuque élevée au niveau de la température optimale, ce qui permet d'obtenir le pourcentage de germination maximale. La température de 21 °C a été le traitement le plus fréquemment observé comme température optimal. C'était le cas pour 38 lots montrant une seule température optimale et dans 64 lots montrant plusieurs températures optimales (une plage des températures), Le traitement à 21 °C est suivi par la température de 15,5 °C, qui est la température optimale pour 29 lots, montrant une seule température optimale et pour 50 lots montrant plusieurs températures optimales. Par contre, les températures de 26,5 et 32 °C ont été les traitements les moins fréquemment observés comme température

optimale. La **figure 2.26** montre également qu'il n'y a pas de grandes différences dans la fréquence de la température optimale entre les traitements de 5 et 10 °C.

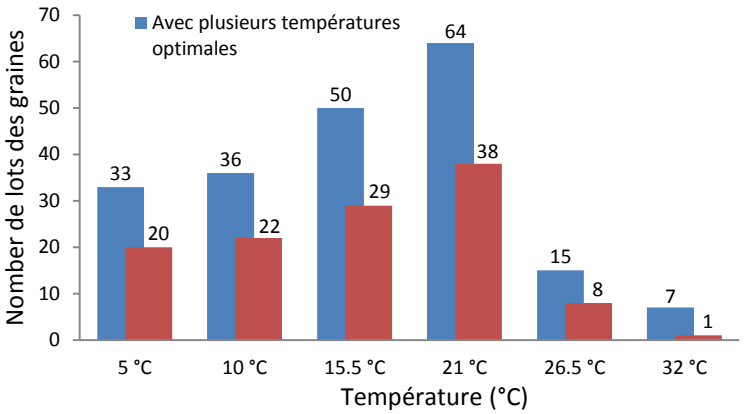


Figure 2.26: Nombre de lots de graines de fétuque élevée qui atteignent un pourcentage de germination maximale pour chaque température.

Des fortes variabilités en réponse à la température entre les lots de graines ont été observées dans la **figure 2.27**, qui met en évidence que 44 % des lots ont un pourcentage de germination maximal entre 80 à 100 %, ce qui représente 70 de 158 lots de graines. De plus, 88 lots ont leur pourcentage de germination maximale inférieur à 80 %. Elle montre également qu'il y a eu 43 lots de graines avec un pourcentage de germination maximale inférieur à 40 %.

Cette variation dans le pourcentage de germination maximal peut être due à des facteurs génétiques et non génétiques (p. ex.: lieu, périodes de stockage et la méthode de stockage). Les lots de graines qui ont été utilisés dans cette recherche proviennent de diverses sources et de différentes périodes de stockage (différentes années de récolte). Nous évaluerons ce facteur dans la suite de cette thèse (chapitre III).

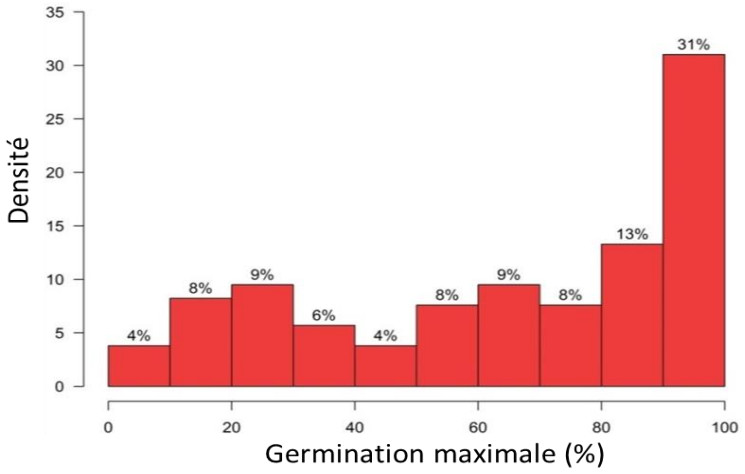


Figure 2.27: Densité pourcentage de germination maximale de différents lots de graines de fétuque élevée.

Dans cette analyse, afin de réduire l'impact des facteurs non génétiques sur la capacité germinative de lots des graines, nous avons décidé de relancer les analyses d'ACP et HCPC uniquement pour les lots de graines dont le pourcentage de germination maximale était supérieure à 40 %, ce qui représente 115 des 158 lots de graines de fétuque élevée.

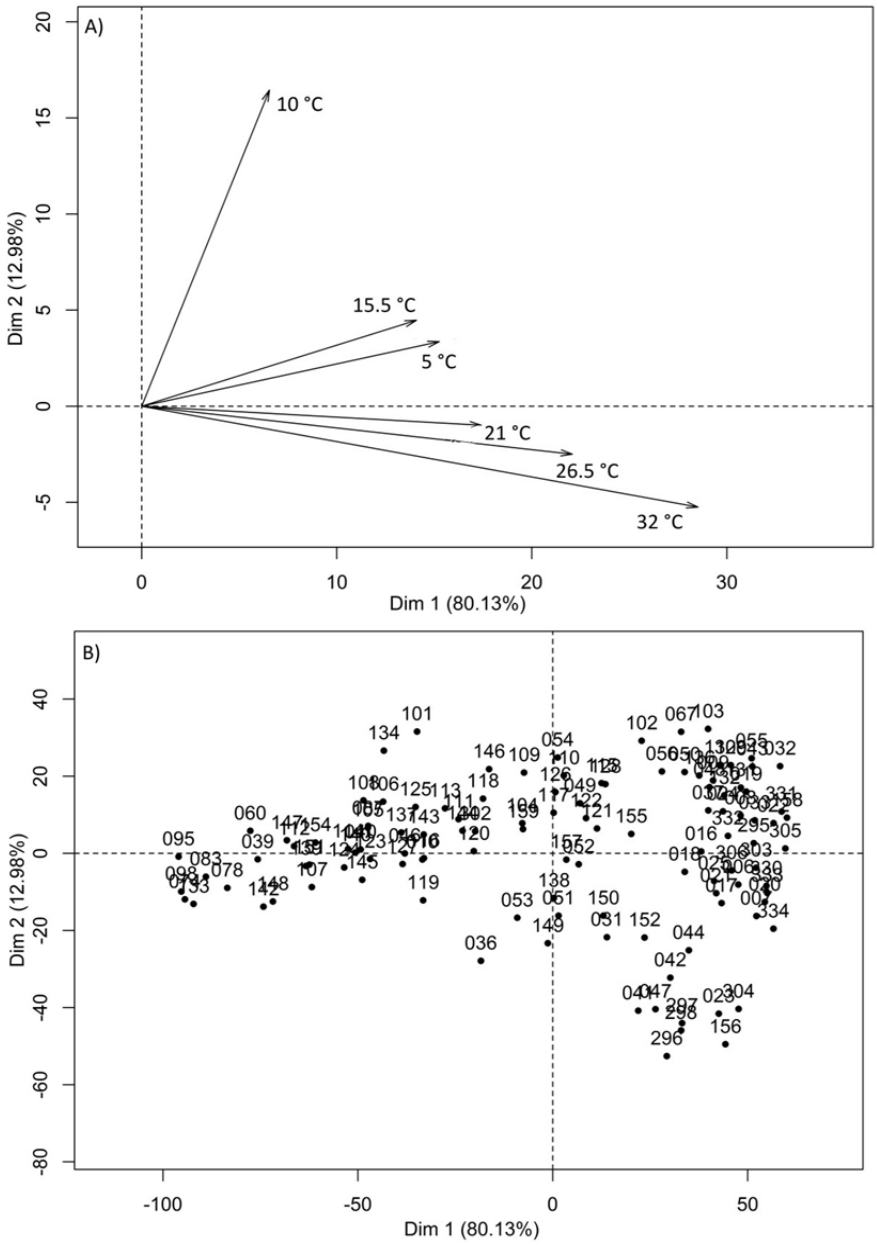


Figure 2.28**:** Analyse en composantes principales (ACP), calculée sur les pourcentages de germination (supérieur à 40 %) observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 115 lots de graines de fétuque élevée**.** A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots de graines sur les deux premiers axes.

La variabilité entre les 115 lots de fétuque élevée a été illustrée par une ACP calculée avec leur réponse à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5; 32 °C) (**Figure 2.28**). Les deux premiers axes représentaient 93 % de la variance. L'axe 1, avec 80 % de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures. L'axe 2, qui correspond à 13 % de la variance totale, a été positivement corrélé aux températures de 5; 10 et 15,5 °C, et négativement corrélé aux températures de 21; 26,5 et 32 °C. La **Figure 2.28B** montre que les lots de graines de fétuque élevée sont distribués sur l'ensemble du diagramme. On déduit de cette analyse qu'il y a toujours une variabilité en réponse à la température entre les lots de graines de fétuque élevée même si des lots ont été écartés des analyses à cause d'une trop faible capacité de germination (<40%), qu'elle soit due à l'âge de lot ou aux conditions de conservation.

Afin de classer les lots de graines de fétuque élevée en fonction de leur réponse à la température, un HCPC a été relancé. Ce HCPC a classé les 115 lots de graines de fétuque élevée en quatre groupes (**Figure 2.29**). Cette classification était basée sur le pourcentage de germination maximal de chaque lot qui était corrélé positivement avec l'axe 1, et le pourcentage de germination à chaque température qui corrélé avec l'axe 2, comme le montre la **figure 2.29A**. Ainsi, chaque groupe représente un type de courbes de réponse aux températures.

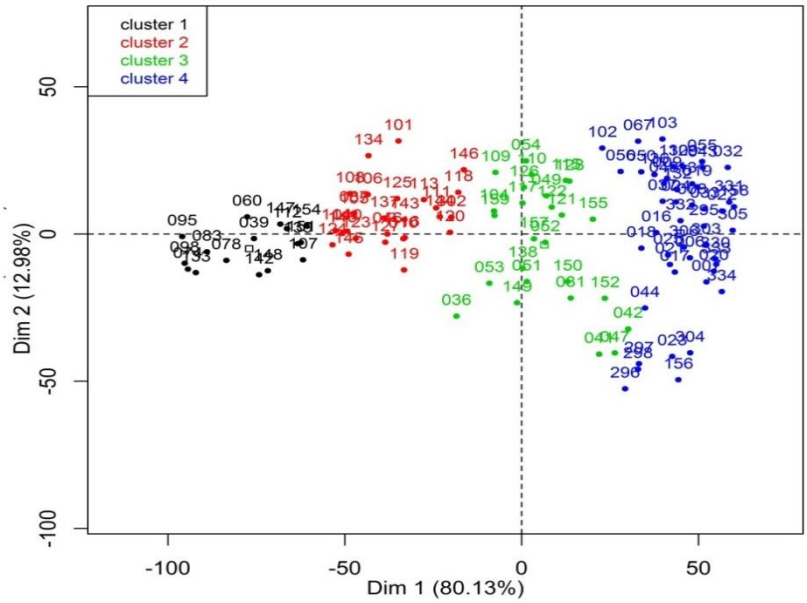


Figure 2.29**:** Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composants principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composants principales (HCPC). Calculée sur les pourcentages de germination (supérieure à 40 %) observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 115 lots de graines de fétuque élevée**.**

Les lots du groupe I ont un pourcentage de germination maximale entre 40 et 67 %, relativement moindre à celui des autres groupes. Les courbes de réponse à la température de ce groupe ont montré que le pourcentage de germination augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminue ensuite avec l'augmentation de la température. Les températures optimales ont été entre 10 et 21 °C dans la majorité des cas. (**Figure 2.30**). De plus, les lots dans ce groupe ont une très faible capacité germinative à 32 °C en comparaison aux groupes III et IV (voir ci-après).

Dans le groupe II, les courbes de réponse à la température montrent qu'il n'y a pas de grandes différences de 5 °C jusqu'à 15,5 °C en pourcentage de germination, puis diminue fortement avec l'augmentation de la température dans la plupart de cas. La température optimale a été entre 5 et 21 °C dans la majorité des lots de ce groupe. Aussi, les lots dans ce groupe ont un pourcentage de germination relativement supérieur à celui du groupe I, notamment à 5 et 32 °C (**Figure 2.30**).

Les lots du groupe III ont un pourcentage de germination maximale entre 72 et 95 %. Les courbes de réponse à la température de ce groupe ont montré que le pourcentage de germination augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminue avec l'augmentation de la température. La température optimale a été entre 15,5 et 26,5 °C dans la plupart des cas de ce groupe, mais dans certains cas, il n'y avait pas de grandes différences entre 5 à 26,5 °C en pourcentage de germination maximale (**Figure 2.30**).

Dans le groupe IV, les lots ont une forte capacité germinative pour tous les traitements, mais dans certains cas, la capacité germinative à 10 °C est plus basse que sous les autres traitements (**Figure 2.30**). Comme expliqué précédemment, pour confirmer que ce phénomène est causé par des causes génétiques plutôt que par une erreur expérimentale, nous avons relancé le traitement de 10 °C pour tous les lots de fétuque élevée. Le résultat a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les résultats du premier et du deuxième test à 10 °C.

Les différents types de courbes de réponse aux températures, qui ont été observés entre les groupes (**Figure 2.30**), reflètent la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Festuca arundinacea Schreb* L.

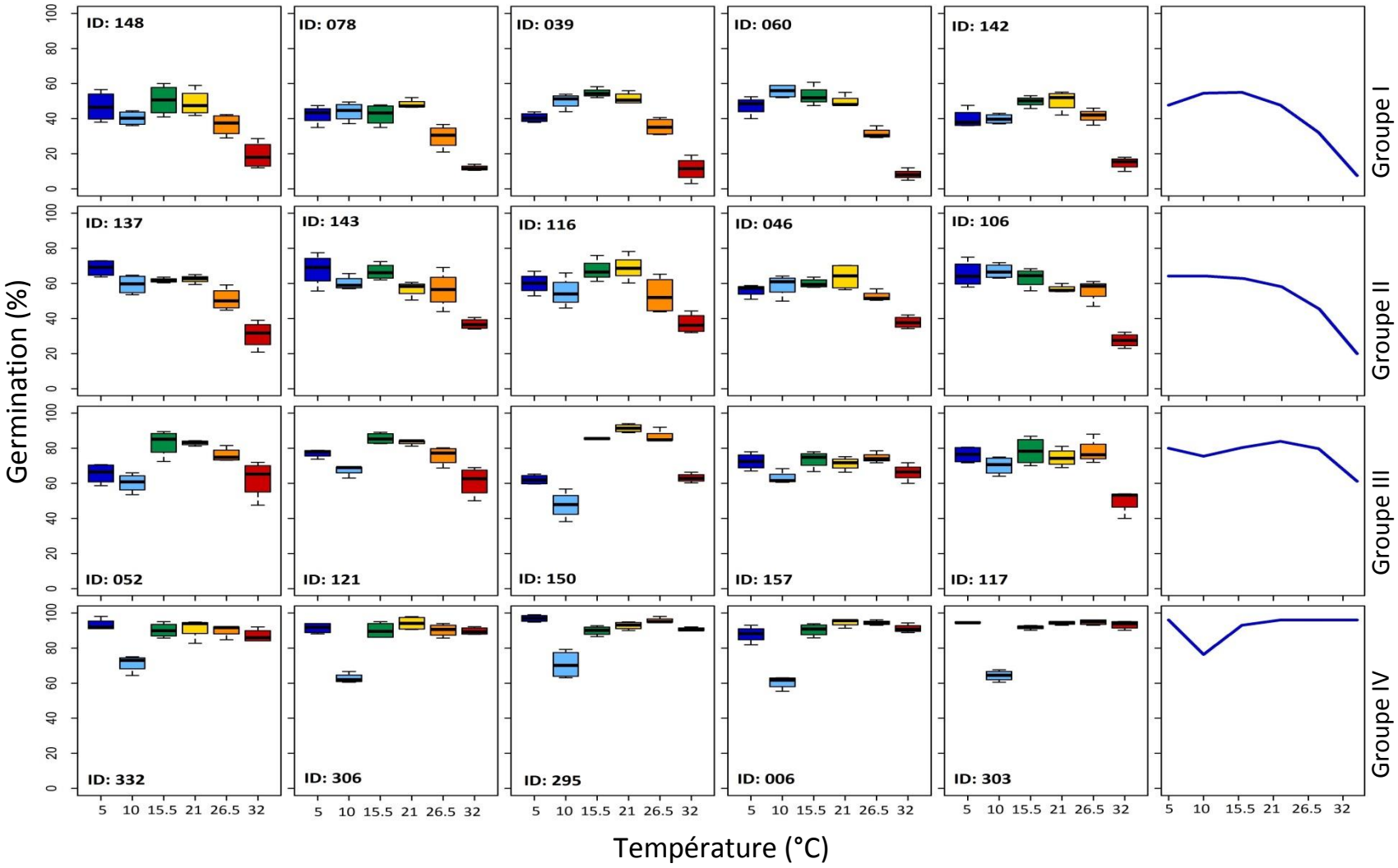


Figure 2.30: parangons (première et dernière colonnes) et exemples de de lots de fétuque élevée montrant différentes formes de courbes de réponse germinative à la température (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C). Les formes des courbes correspondent au groupe identifié par l'analyse HCPC

La **figure 2.31** montre qu'il n'y a pas de corrélation claire entre les groupes de type de germination et l'origine géographique de lots dans ces groupes. Cela peut être logique parce que l'analyse HCPC a classé les lots de graines en quatre groupes, en prenant en considération les pourcentages de germination dans tous les traitements. De plus, la **figure 2.28** montre que le pourcentage de germination maximale observée de chaque lot à n'importe quelle température a été distingué en fonction de l'axe 1, qui représentent un total de 80,13 % de la variance.

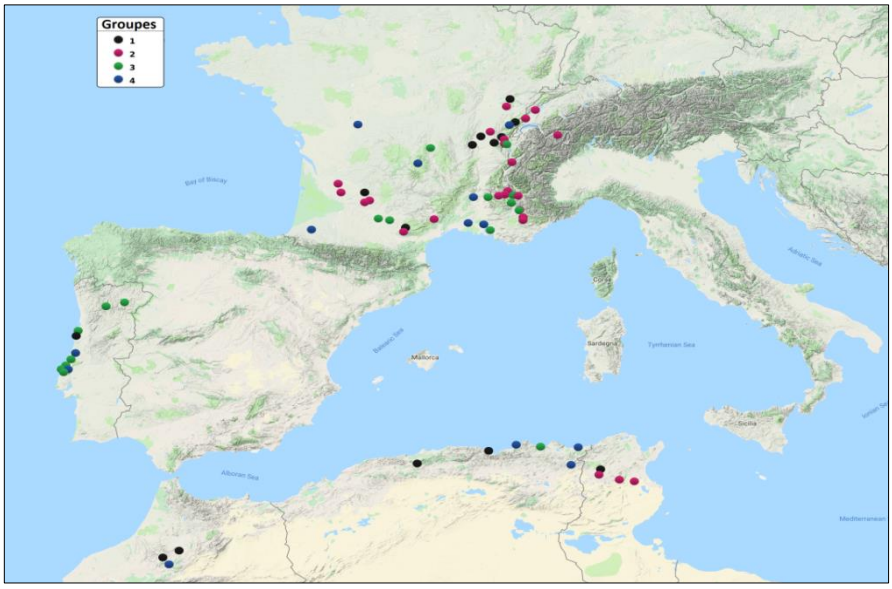


Figure 2.31: Sites de collecte des lots de graines de Fétuque élève naturelles, chaque couleur représente un groupe, calculée sur les pourcentages de germination observés.

On a vu précédemment que les lots appartenant aux groupes I et II ont des réponses germinatives à la température très marquées. En particulier la germination à 32 °C est beaucoup plus basse que la germination observée à la température optimale. Donc, dans la recherche des liens entre la réponse germinative et le lieu de provenance, nous avons étudié la relation entre le pourcentage de germination à 5 °C et 32 °C et le nombre de jours avec température maximale de l'air inférieure à 0 °C au cours des deux dernières semaines de l'année. Plus cette dernière variable climatique est forte, plus l'hiver est froid. La **figure 2.32** montre qu'il 'y a une relation significative entre ces deux variables. Comme prévu, on observe que plus la population vient d'un endroit froid moins elle germe bien à 5 °C, et inversement plus elle germe bien à 32 °C.

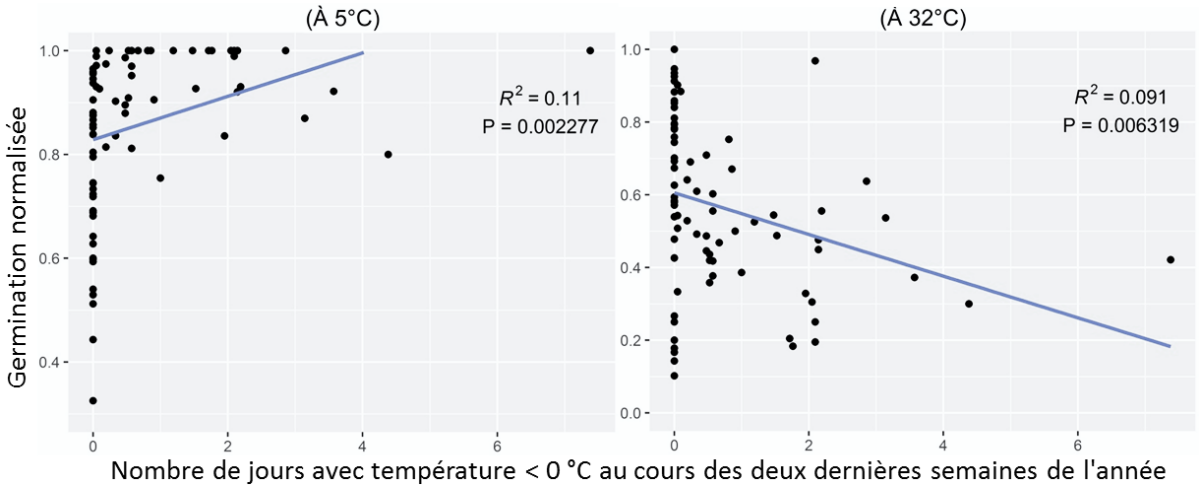


Figure 2.32: Relation entre le pourcentage de germination normalisée et le nombre de jours avec température maximale de l'air inférieure à 0 °C au cours des deux dernières semaines de l'année (moyenne sur la période 1989-2010) à 5 et 32 °C de lots de graines sauvage de fétuque élevée.

3.2.2 Effets de la température sur la vitesse de germination

Dans cette analyse, 93 lots de fétuque élevée ont été évalués. Plusieurs paramètres qui relient la germination au temps ont été calculés: le temps de début de germination (*tc*), la vitesse maximale de germination (a) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$).

3.2.2.1 Temps initial apparent de germination (*tc*)

Afin de comparer l'effet de la température sur le temps initial apparent de germination (*tc*) entre les lots de graines de fétuque élevée, une ACP a été réalisée sur de valeurs estimées de *tc* calculées à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5; 32 °C) (**Figure 2.33**). L'axe 1, qui représente un total de 96 % de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures. L'axe 2, qui correspond à moins de 3 % de la variance totale a été négativement corrélé au traitement 5 °C mais positivement corrélé aux autres traitements. Les valeurs estimées maximales de *tc* de chaque lot ont été principalement distingués en fonction de l'axe 1

L'analyse HCPC a classé les 93 lots de graines de fétuque élevée en trois groupes sur la base des valeurs estimées de temps initial apparent (*tc*) de chaque lot (**Figure 2.34**). Chaque groupe représente un type de courbes de réponse aux températures, en particulier à 5 °C.

La **figure 2.36** montre que les courbes des valeurs estimées de *tc* dans tous les groupes ont presque la même forme. De plus, elle a montré que *tc* diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis augmente avec

l'augmentation de la température jusqu'à 26,5 °C, ensuite augmente avec l'augmentation de la température Généralement, *tc* est le plus élevé à 5 °C en comparaison avec d'autres traitements.

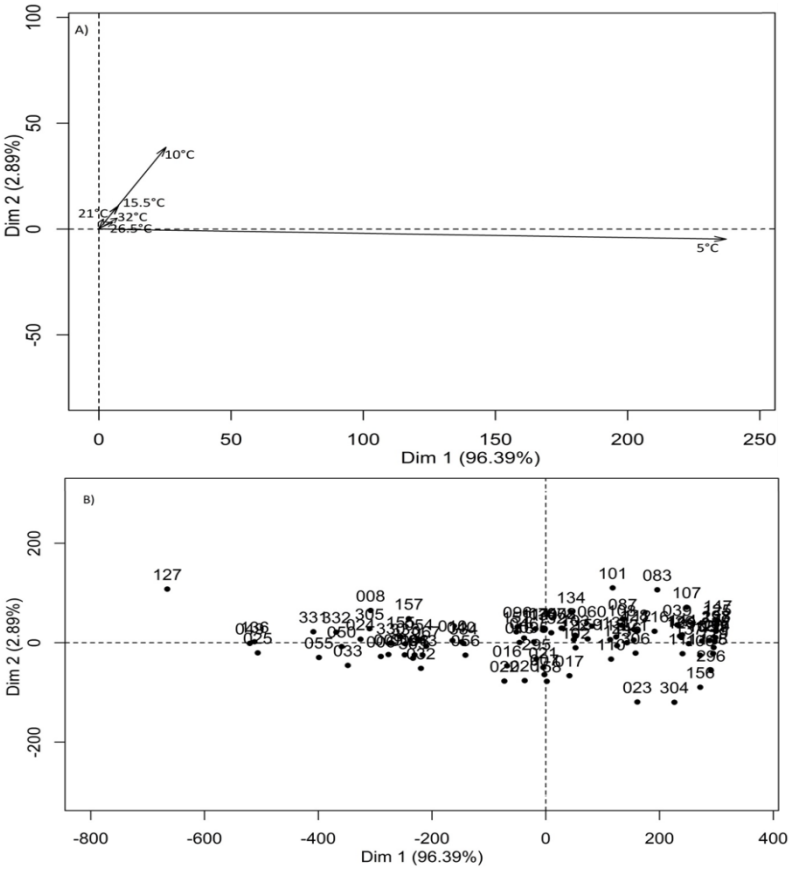


Figure 2.33: Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur le temps initial apparent estimés (*tc*) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

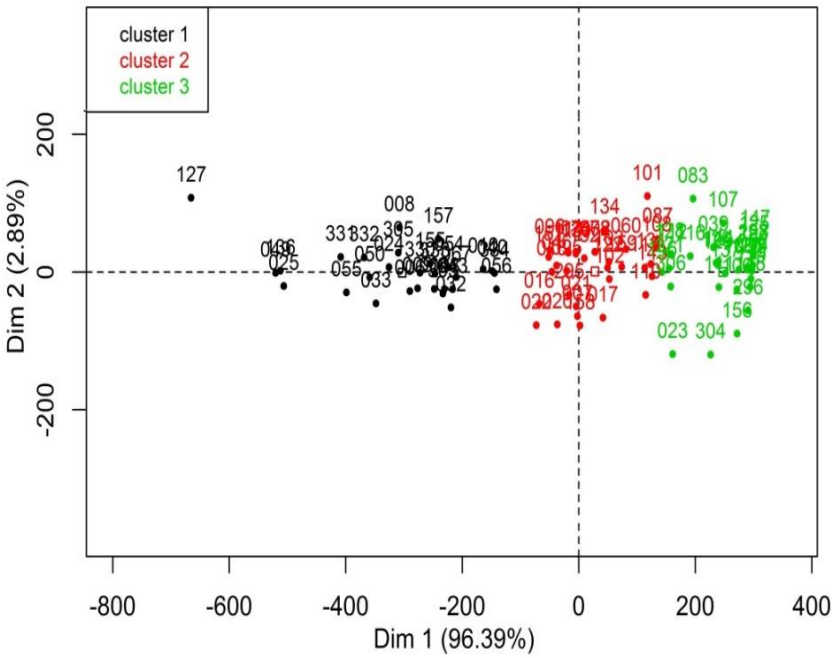


Figure 2.34: Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC), calculée sur le temps initial apparent estimés (*tc*) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Dans le groupe I, les lots ont une faible valeur estimée de *tc* en comparaison avec d'autres groupes, notamment le traitement de 5 °C (**Figure 2.36**). De plus, il n'y a pas de grandes différences en valeur estimée de *tc* entre les températures de 10 °C jusqu'à 32 °C. Ce sont des lots qui germent très peu de temps après la mise en eaux, y compris à 5 °C.

Les lots dans le groupe II, ont une valeur estimée de *tc* inférieure à celle des groupes III et plus élevé que le groupe I (**Figure 2.36**).

Dans le groupe III, les lots ont une forte valeur estimée de *tc* dans toutes les températures en comparaison avec des groupes I et II, surtout les traitements à 5 et 10 °C.

La **figure 2.35** montre qu'il n'y a pas de corrélation claire entre les groupes de type de courbes du temps initial apparent estimé (*tc*) et l'origine géographique de lots dans ces groupes. Cela peut être logique parce que le HCPC a classé les lots de graines en trois groupes, en prenant en considération les valeurs estimées de *tc* dans tous les traitements. De plus, **la figure 2.33** montre que la valeur estimée de *tc* de chaque lot à n'importe quelle température a été distinguée en fonction de l'axe 1, qui représentent 96 % de la variance totale.

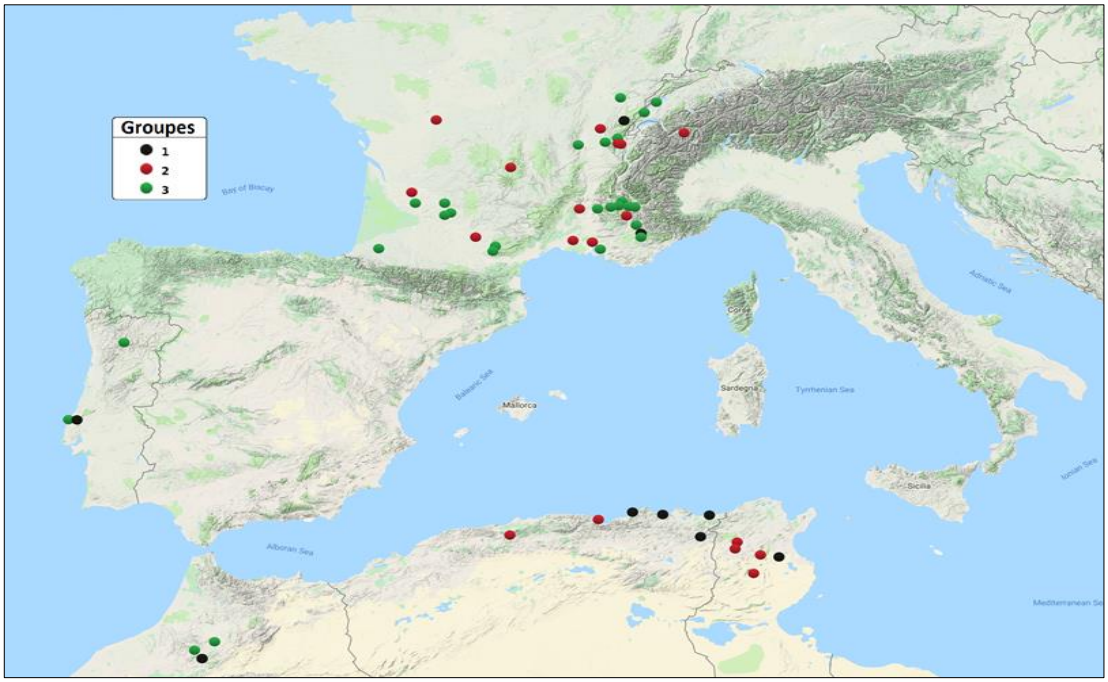


Figure 2.35: Sites de collecte de lots de graines de Fétuque élevée naturelles, chaque couleur représente un groupe, calculée sur le temps initial apparent estimés (*tc*).

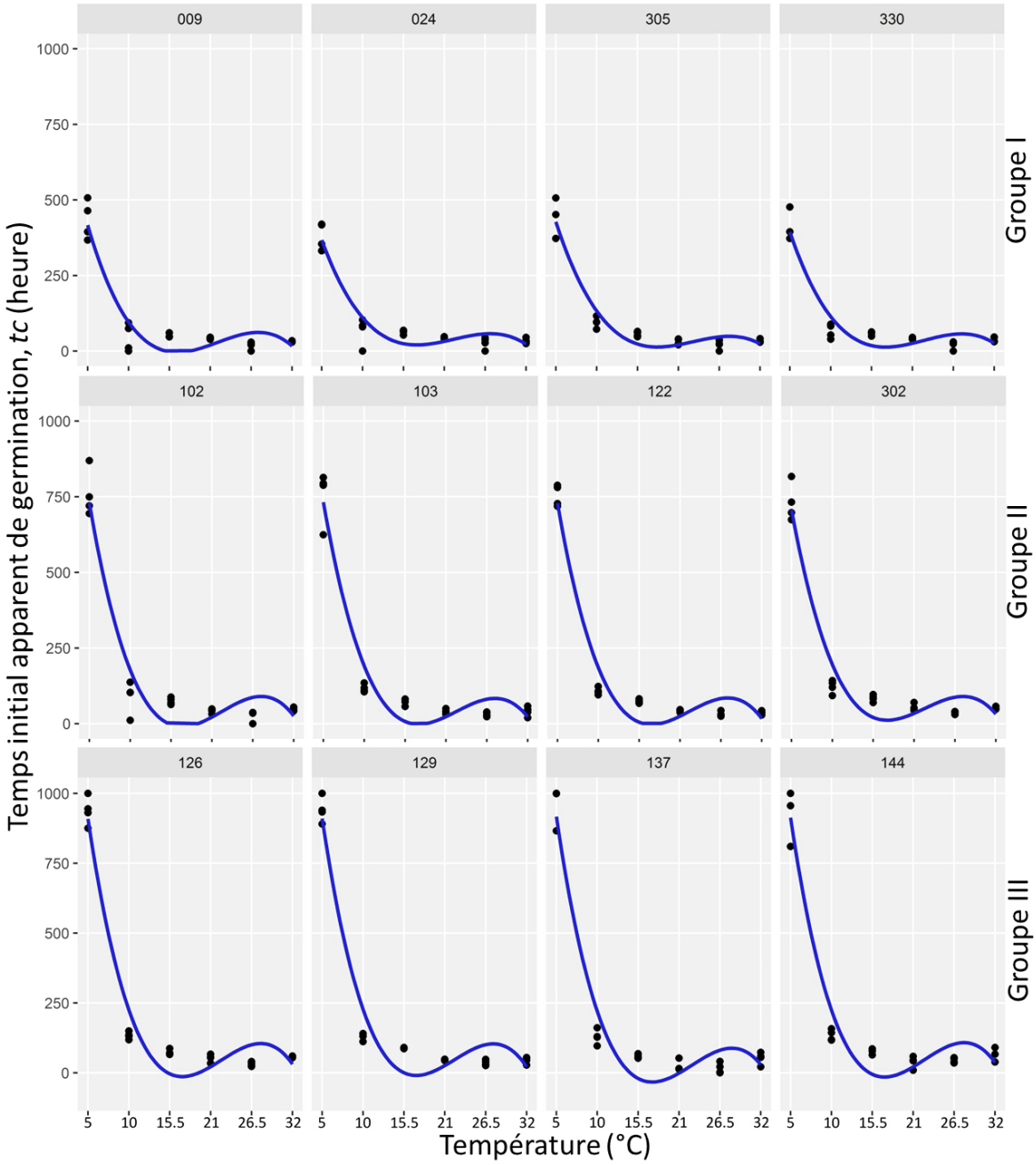


Figure 2.36: Exemples de parangons et de valeurs estimées du temps initial apparent de germination (*tc*) en fonction de la température de lots de graines fétuque élevée, Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponse germinative à la température (Groupes 1-3)

3.2.2.2 Vitesse maximale de germination (α)

Afin de comparer l'effet de la température sur la vitesse maximale de germination (α) entre les lots de graines de fétuque élevée, une analyse ACP a été réalisée sur les valeurs estimées d'α à six températures (5; 10; 15,5; 21, 26,5; 32 °C) (**Figure 2.37**). Les deux premiers axes représentent 96,16 % de variabilité des données. L'axe 1, qui représente 93 % de variabilité, a été positivement corrélé à toutes les températures, notamment le traitement à 5 °C. L'axe 2, qui correspond à 4 % de la variance totale a été positivement corrélé aux traitements 5; 10; 15,5 °C et négativement corrélé aux traitements 21; 26,5 et 32 °C (**Figure 2.37A**). La **figure 2.37B** montre que les lots de fétuque élevée ont été distribués sur l'ensemble du diagramme. La vitesse maximale de germination de chaque lot a été distinguée en fonction de l'axe 1, et la vitesse de germination des traitements dans chaque lot ont été distinguées en fonction de l'axe 2.

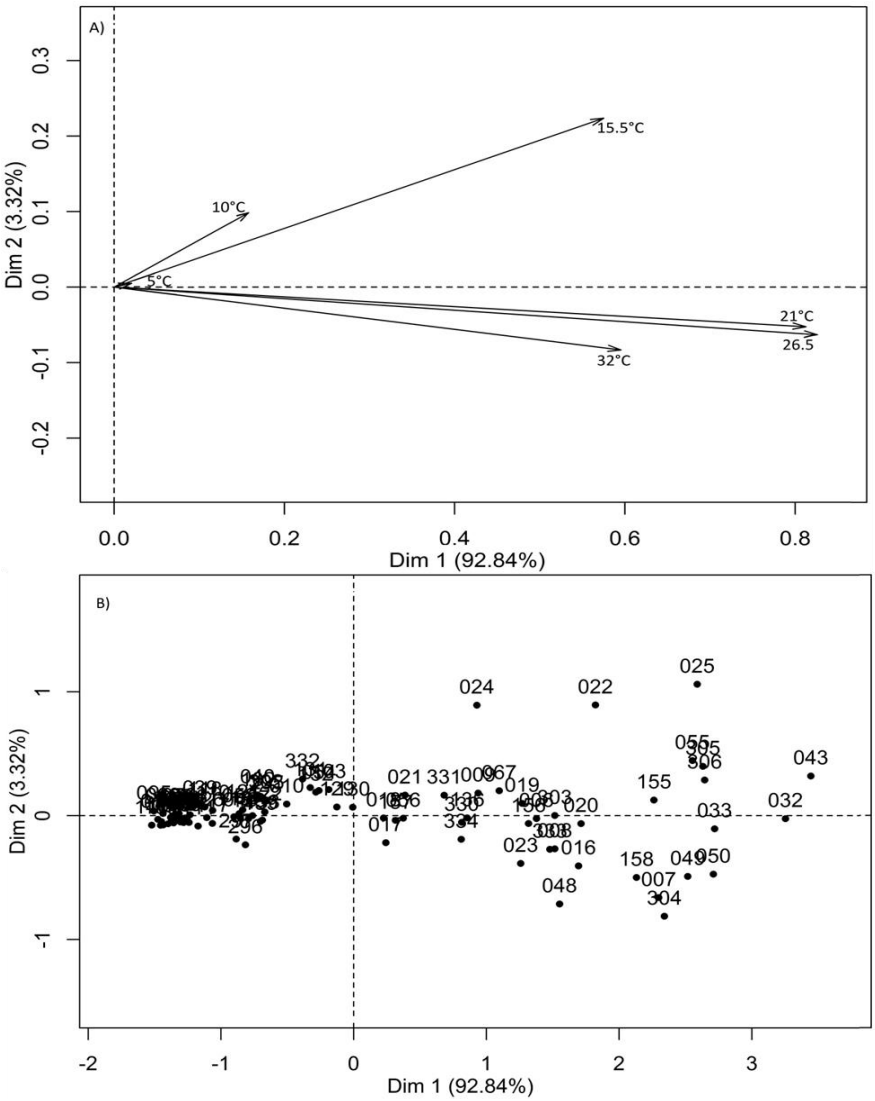


Figure 2.37**:** Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur la vitesse maximale de germination estimée (α) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée**.** A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Afin de classer les lots de graines en fonction de leur vitesse de germination maximale (α) en réponse aux températures, un HCPC a été réalisé. Cette HCPC a classé les lots de graines en trois groupes (**Figure 2.38**). Cette classification a été effectuée sur i) la valeur estimée d'α de chaque lot, indépendement de la température à laquelle elle est obtenue, et ii) la valeur estimée d'α moyenne à pour'une des température pour chaque lot. Chaque groupe représente un type de réponse à la températures en termes de vitesse maximale de germination (α).

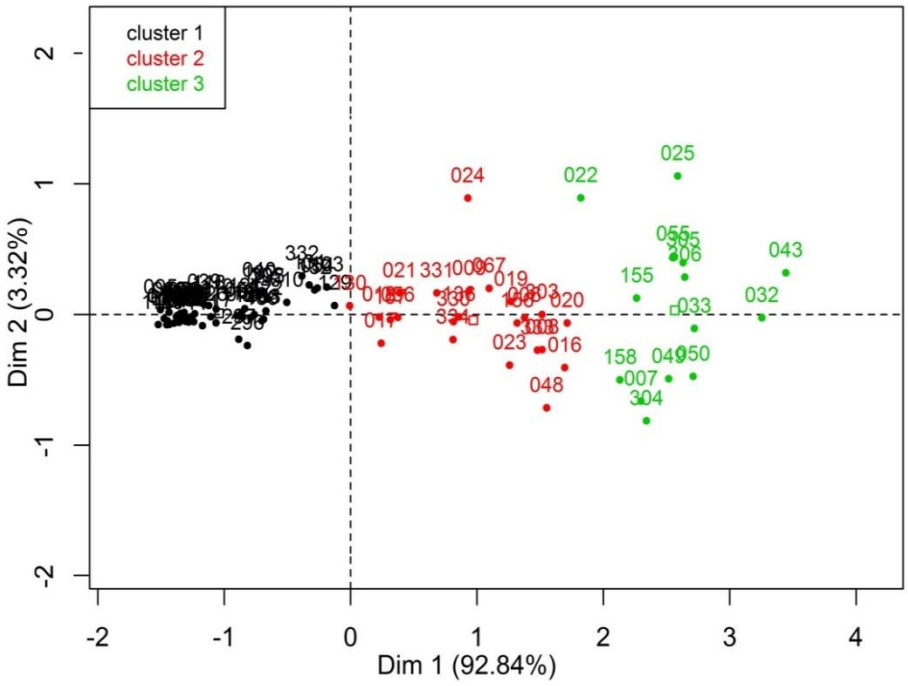


Figure 2.38: Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC), calculée sur la vitesse maximale de germination estimée (α) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Les lots dans le groupe I ont une vitesse maximale de germination estimée (α) beaucoup moins rapide à celui des autres groupes. Les courbes de valeurs estimées α ont montré que α augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminue fortement avec l'augmentation de la température. La température optimale a été entre 21 et 26,5 °C dans ce groupe. De plus, les lots dans ce groupe ont une vitesse de germination très lente à 5 °C en comparaison à d'autres températures (**Figure 2.39**).

Dans le groupe II, les courbes de valeurs estimées α ont montré une augmentation avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale (entre 21 et

26,5 °C), puis diminue avec l'augmentation de la température (**Figure 2.39**). Les lots dans ce groupe ont une vitesse de germination estimée (α) plus rapide à celui du groupe I et moins rapide à celui du groupe III. De plus, les lots dans ce groupe ont une vitesse de germination moins rapide à 5 °C en comparaison à d'autres températures.

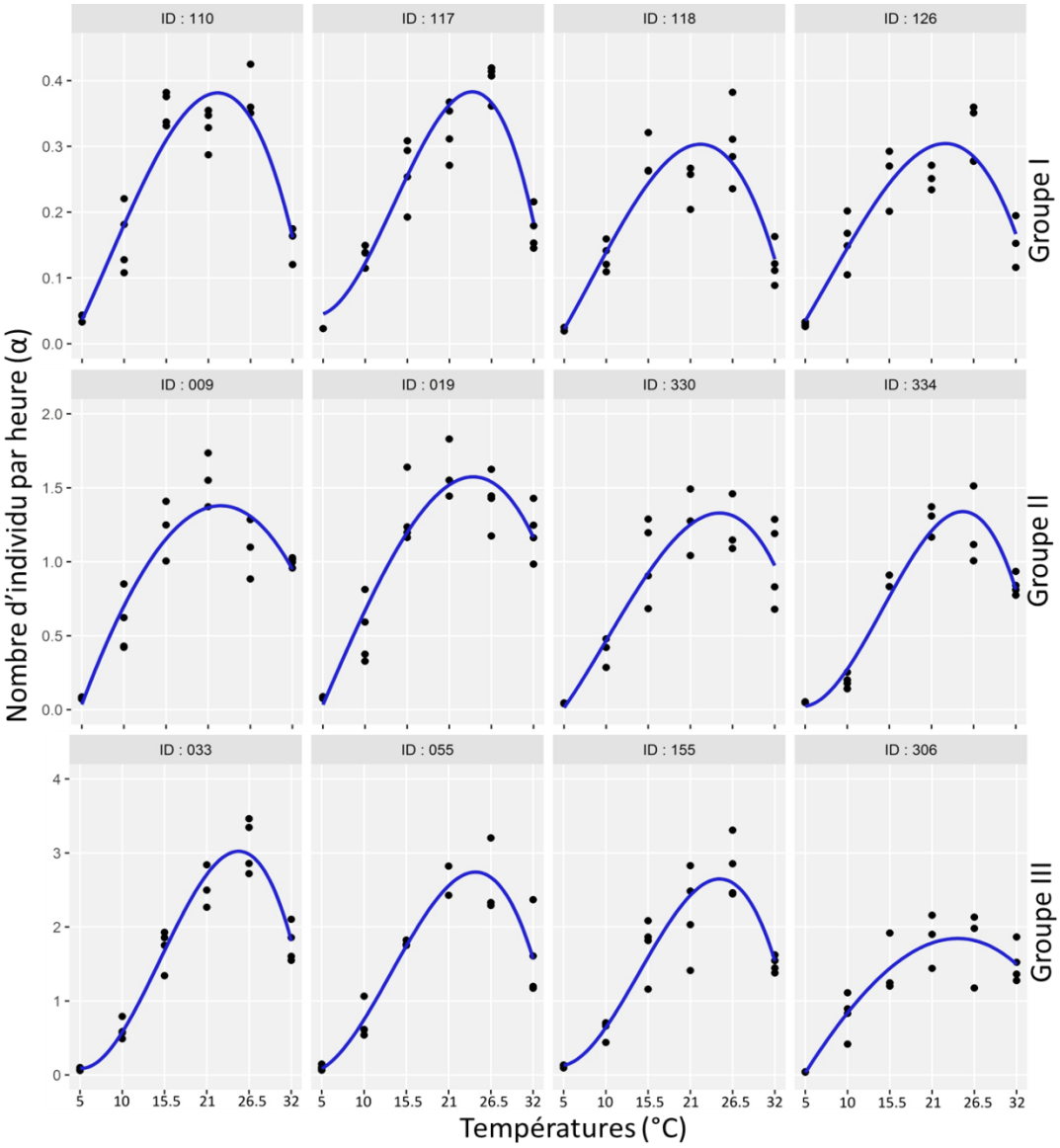


Figure 2.39: Exemples de parangons et de valeurs estimées de la vitesse maximale de germination (α) en fonction de la température de lots de graines fétuque élevée, Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponse germinative à la température (Groupes 1-3)

Dans le groupe III, les courbes de valeurs estimées α ont montré qui les vitesses de germination augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale (entre 21 et 26,5 °C), puis diminue avec l'augmentation de la température (**Figure 2.39**). Généralement, les lots dans ce groupe ont une vitesse de germinations

estimée (α) plus rapide à celui du groupe I et III à toutes les températures excepté le traitement de 5 °C.

Les différents types de courbes de la vitesse maximale de germination (α) en réponse à la température, qui ont été observés entre les groupes (**Figure 2.39**), reflètent la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Festuca arundinacea* Schreb L.

3.2.2.3 Temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$)

Les variations entre les lots de fétuque élevée ont été illustrées par une ACP calculée sur le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) (**Figure 2.40**). Les deux premiers axes expriment un total de 94 % de variabilité des données. L'axe 1, qui montre un total de 75 % de la variation, a été positivement corrélé à toutes les températures. L'axe 2, qui montre 19 % de la variance totale, a été positivement corrélé à toutes les températures, sauf pour le traitement de 5 °C qui a été négativement corrélé.

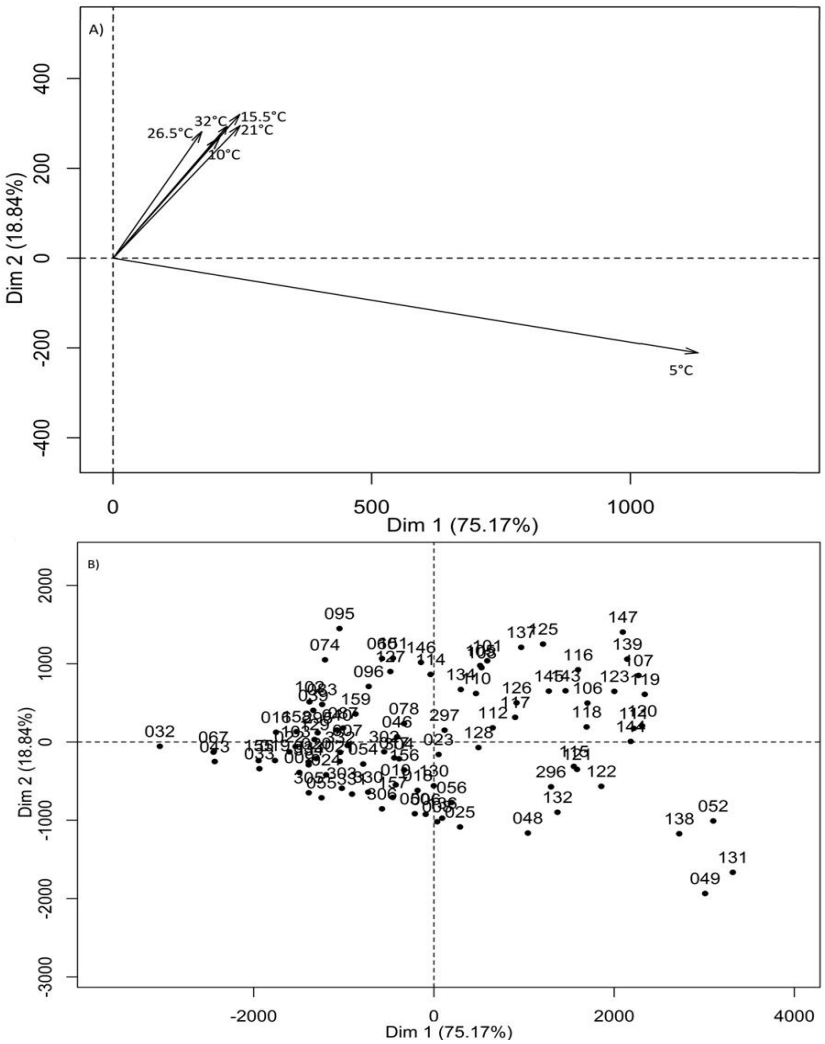


Figure 2.40: Analyse en composantes principales (ACP) calculée sur le temps à 95 % de germination finale estimé ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution des lots sur les deux premiers axes. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

Les lots de fétuque élevée ont été distribués dans tout le diagramme. Le $t_{95\%}$ de chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 1, et le $t_{95\%}$ de chaque traitement dans chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 2 (**Figure 2.40B**). On déduit de cette analyse qu'il y avait une forte variabilité dans le temps requis pour atteindre 95 % de la germination finale entre les lots de graines de fétuque élevée en réponse à la température.

Ensuite, l'analyse HCPC a classé les 93 lots de graines de fétuque élevée en trois groupes (**Figure 2.41**) cette classification était basée sur le $t_{95\%}$ en réponse aux températures. Chaque groupe représente un type de l'effet des températures sur le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale.

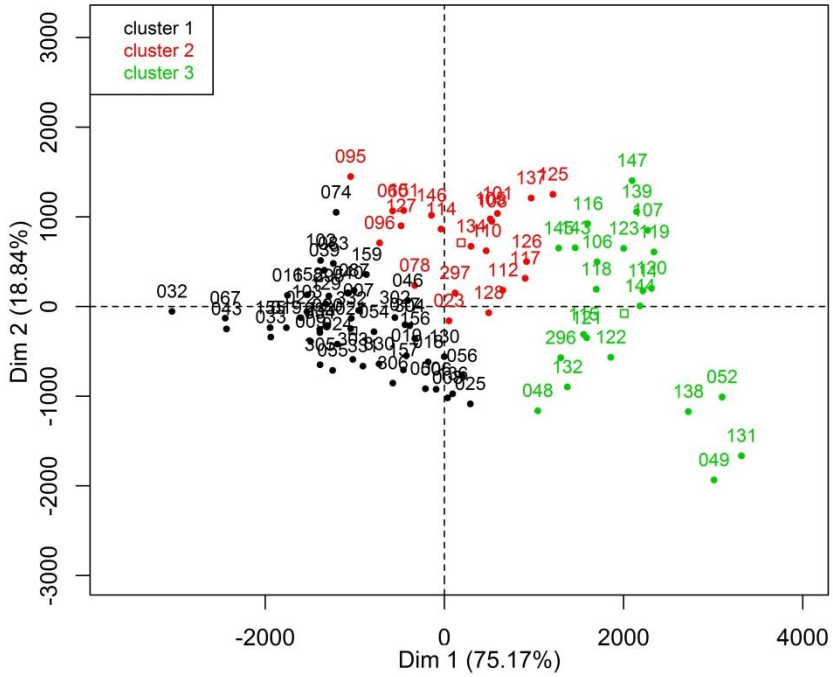


Figure 2.41: Classification des lots de graines individuels sur la base de l'analyse des composants principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC), calculée sur le temps à 95 % de germination finale estimé ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée. Chaque chiffre est l'identifiant d'un lot.

La **figure 2.42** montre que les courbes des valeurs estimées de $t_{95\%}$ dans tous les groupes ont presque la même forme. De plus, ils ont montré que $t_{95\%}$ diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis reste constant jusqu'à 21 °C, ensuite augmente avec l'augmentation de la température (**Figure 2.42**). Généralement, $t_{95\%}$ est le plus élevé à 5 °C.

Dans le groupe I, les lots ont une petite valeur estimée $t_{95\%}$ en comparaison avec d'autres groupes. De plus, les lots dans ce groupe requièrent moins de temps pour atteindre 95 % de la germination finale que les autres groupes, notamment à 5 °C (**Figure 2.42**).

Les lots dans le groupe II ont une valeur de $t_{95\%}$ inférieure à celui des groupes III mais plus élevée que le groupe I. De plus, il n'y a pas de grandes différences en valeur estimée de $t_{95\%}$ entre les températures de 10 à 32 °C (**Figure 2.42**).

Dans le groupe III, les lots ont une grande valeur estimée de $t_{95\%}$ dans toutes les températures en comparaison avec d'autres groupes en particulier à 5 °C (**Figure 2.42**).

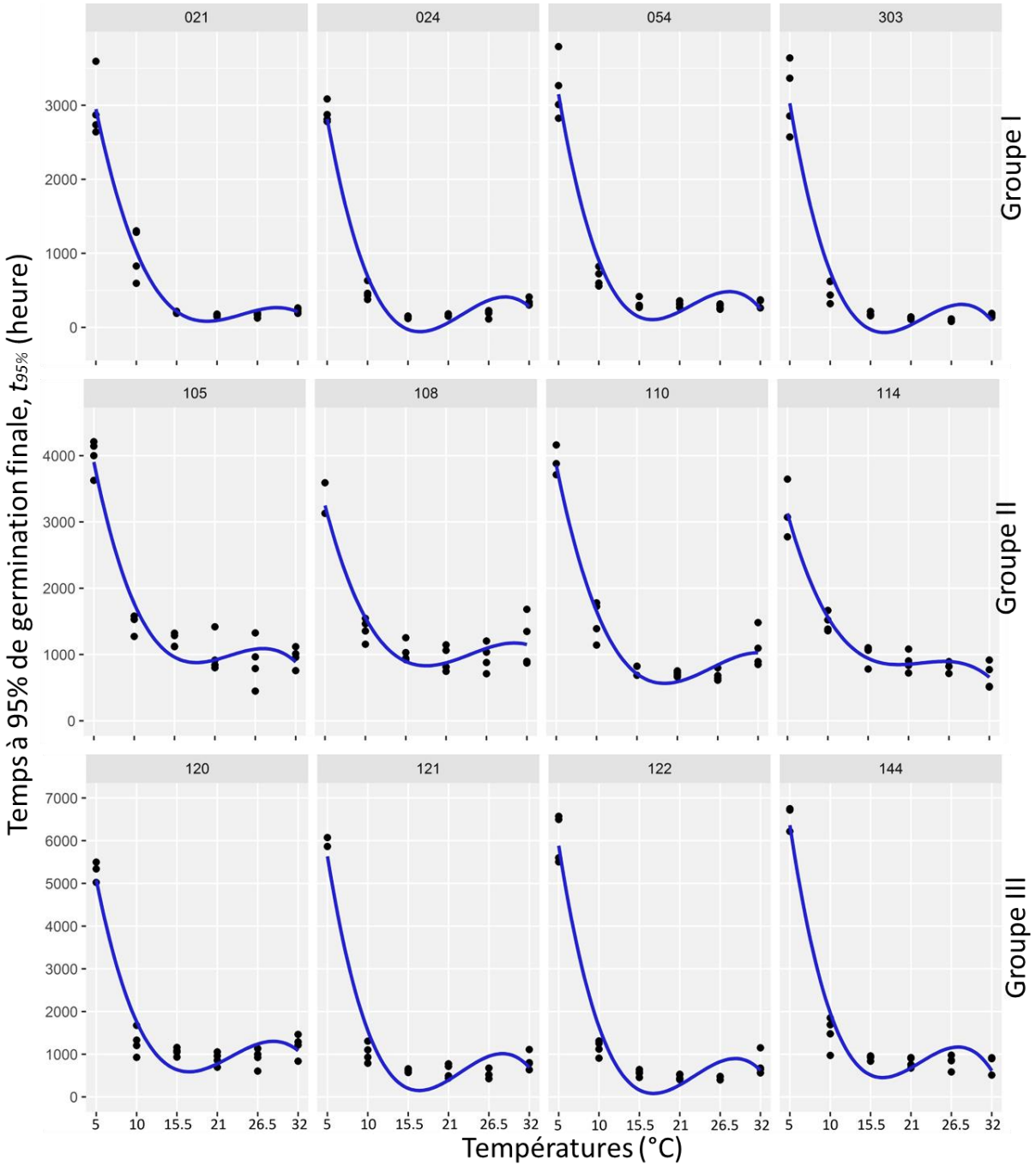


Figure 2.42: Exemples de parangons et de valeurs estimées du temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) en fonction de la température de lots de graines de fétuque élevée. Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponses germinatives à la température (Groupes 1-3)

3.2.2.4 Relation entre le temps initial apparent (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$)

Les réponses germinatives aux températures constantes étaient significativement différentes à l'intérieur et entre des lots pour ces deux paramètres. En général, les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ ont diminué lorsque la température a augmenté jusqu'à la température optimale, puis sont restes constantes ou ont augmenté un petit peu avec l'augmentation de la température. Nous avons posé l'hypothèse qu'il existe une relation linéaire entre le temps initial apparent (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) en réponse à la température constante de 5 à 35 °C.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la relation entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ de chaque traitement pour 93 lots de fétuque élevée. Des régressions linéaires significatives ($P \leq 0,05$) ont été ajustées entre les deux variables (**Figure 2.43**). Il existe des relations significatives entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ pour les traitements à 5; 10; 15,5 et 26,5 °C, et les relations sont non significatives pour les traitements à 21 et 32 °C.

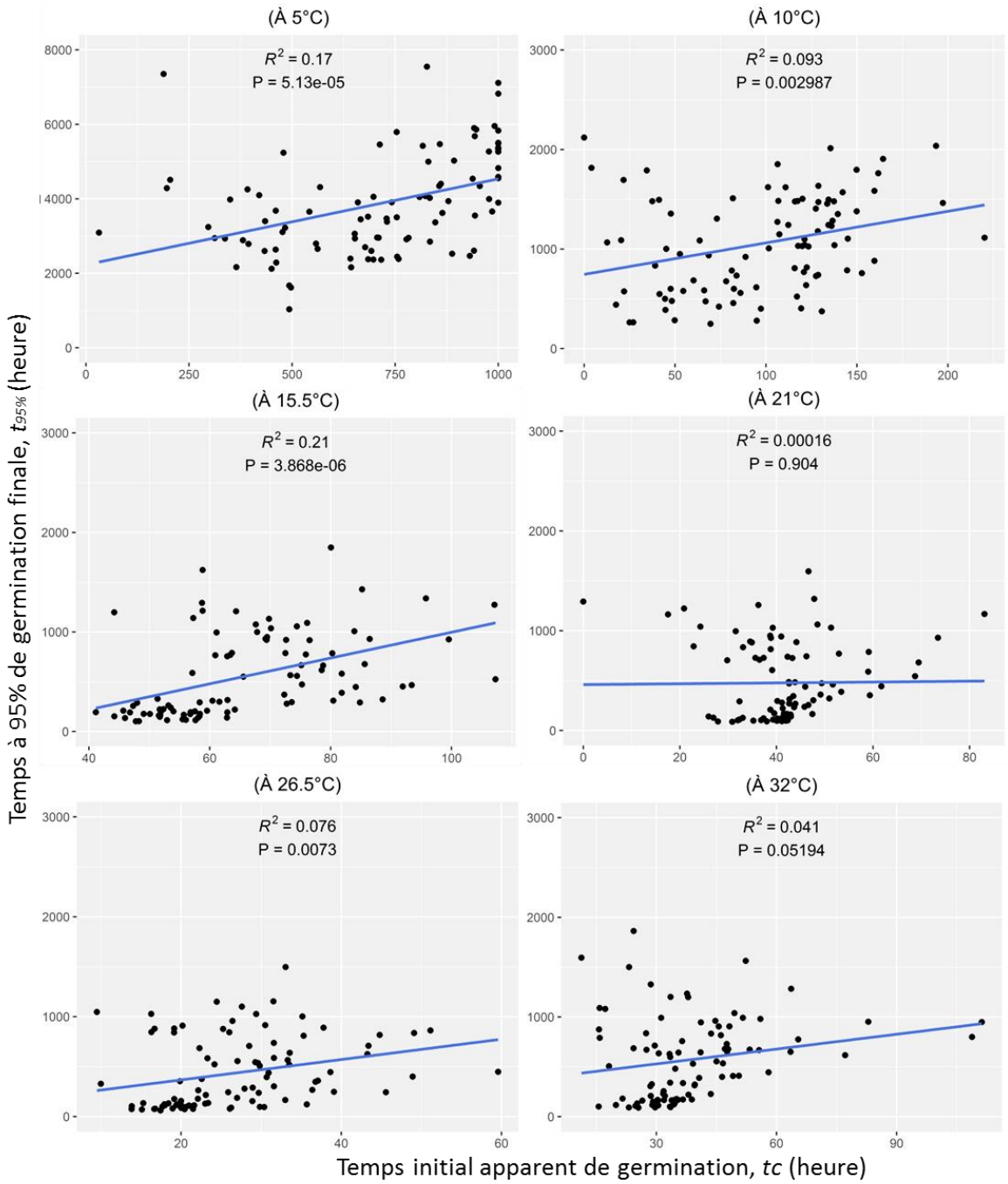


Figure 2.43: Relation entre les valeurs estimées de *tc* et de $t_{95\%}$, à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 93 lots de graines de fétuque élevée.

3.3. Analyse de la diversité génétique de la réponse germinative à la température de populations de *Dactylis glomerata* L.

3.3.1. Effets de la température sur le pourcentage de germination maximale

Dans cette analyse, dix lots de dactyle ont été évalués. Les graines ont été obtenues de différentes sources et les tests de germination ont été faits selon six traitements de 5 à 32 °C, comme décrit en détail dans le premier chapitre.

Pour chaque lot, des graphiques de type boîtes à moustaches ont été faits pour chaque ensemble des données en fonction des températures (Annexe 2.3). Ces graphiques montrent bien qu'il existe une forte variabilité en réponse aux températures entre les lots de dactyle et qui il y a une forte différence en pourcentage de germination entre les températures dans le même lot.

La variabilité entre les 10 lots de dactyle a été illustrée par une ACP réalisée sur leur réponse aux six températures (**Figure 2.44 A**). L'axe 1, qui explique 62 % de la variation totale, a été corrélé positivement à toutes les températures, particulièrement le traitement à 15,5 °C. L'axe 2, avec 27 % de la variance, a été positivement corrélé aux traitements à 10; 15,5; 26,5 et 32 °C et négativement corrélé aux traitements à 21 et 5 °C (**Figure 2.44 A**). La **Figure 2.44B** montre que les lots de dactyle sont distribués sur l'ensemble du diagramme. On déduit de cette analyse qu'il y a une variabilité en réponse à la température entre les lots de graines de dactyle.

L'analyse HCPC a classé les 10 lots de dactyle en quatre groupes basés sur le pourcentage de germination maximale de chaque lot (**Figure 2.44B**). Chaque groupe représente un type de courbes de réponse aux températures.

Les lots du groupe I ont un pourcentage de germination maximale d'environ 47 %, relativement moindre à celui des autres groupes. Les courbes de réponse à la température de ce groupe ont montré qu'il n'y a pas de grandes différences entre les traitements de 10 jusqu'à 32 °C (**Figure 2.45**).

Dans le groupe II, les lots ont un pourcentage de germination maximale de 94 %. Les courbes de réponse à la température de ce groupe ont montré que la réponse aux températures a été très marquée dans ce groupe (**Figure 2.45**).

Les lots dans le groupe III ont un pourcentage de germination maximale entre 76 et 99 %. Les courbes de réponse aux températures ont montré que le pourcentage de germination augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température

optimale, puis diminue avec l'augmentation de la température, mais dans certains cas il n'y a pas de grandes différences entre 5 et 26,5 °C en pourcentage de germination maximale (**Figure 2.45**). De plus, les lots dans ce groupe ont une faible capacité germinative à 32 °C en comparaison au groupe I.

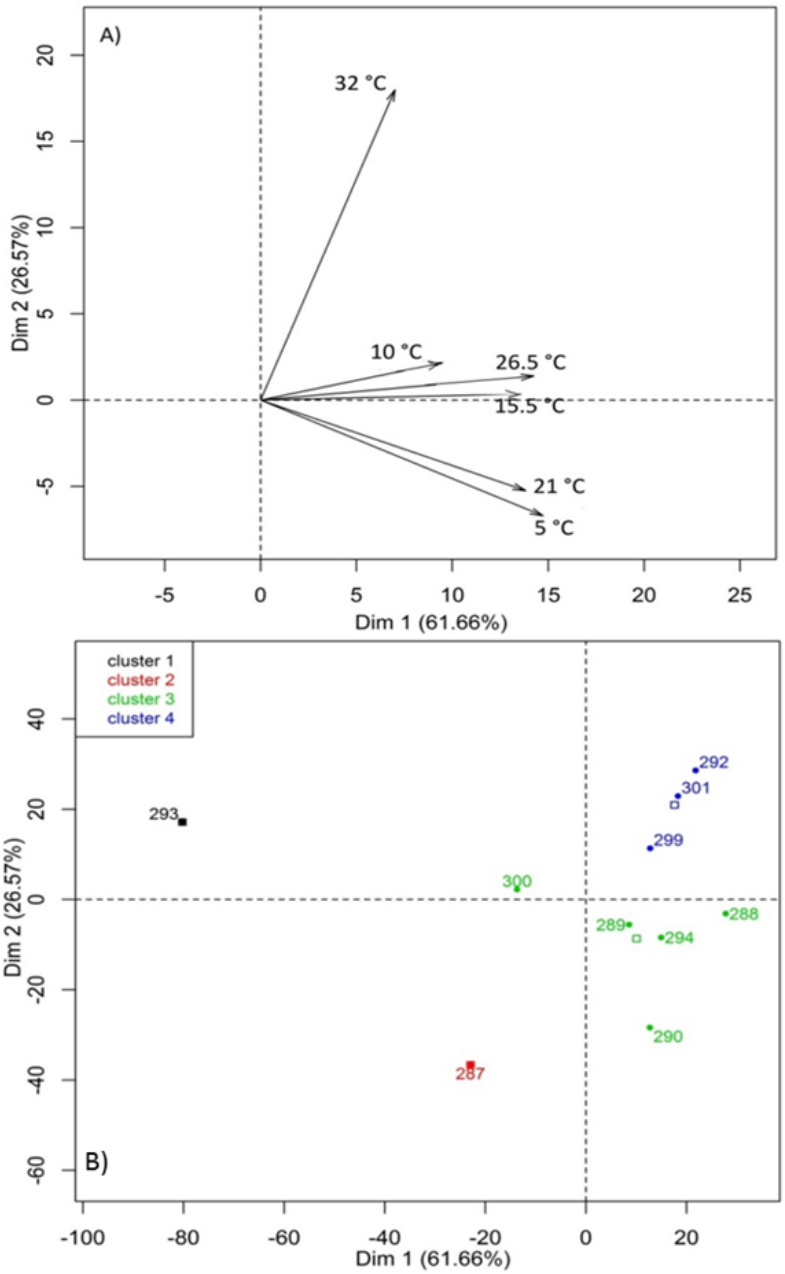


Figure 2.44: Analyse en composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC) calculée sur les pourcentages de germination observés à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 10 lots de graines de dactyle. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution et Classification des lots de graines sur les deux premiers axes.

Dans le groupe IV, les lots ont une forte capacité germinative pour toutes les températures, mais dans certains cas la capacité germinative à 10 °C est plus basse que sous les autres traitements (**Figure 2.45**). Les lots dans ce groupe ont un pourcentage maximum de germination supérieur à 87 %.

Les différents types de courbes de réponse aux températures, qui ont été observés entre les groupes (**Figure 2.45**), reflètent la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Dactylis glomerata* L.

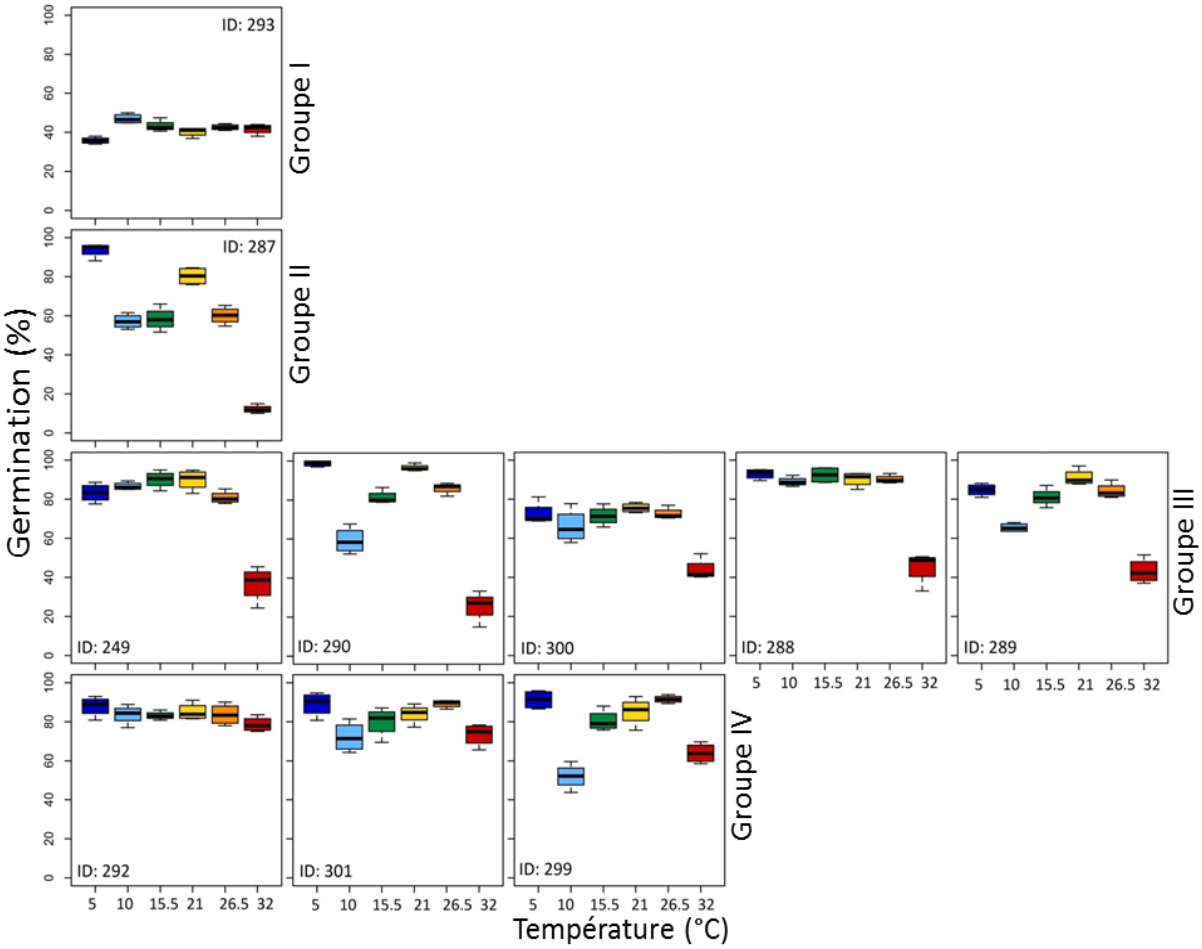


Figure 2.45: Parangons et exemples de de lots de dactyle montrant différentes formes de courbes de réponse germinative à la température. Les formes des courbes correspondent aux groupes identifiés par l'analyse HCPC

3.3.2. Effets de la température sur la vitesse de germination

Dans cette analyse, dix lots de dactyle ont été évalués, plusieurs paramètres qui relient la germination au temps ont été calculés: la vitesse maximale de germination (*a*), le temps de début de la germination (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$).

3.3.2.1. Temps initial apparent de germination (*tc*)

Afin de comparer l'effet de la température sur le temps initial apparent de germination (*tc*) entre les lots de graines de dactyle, une ACP a été réalisée sur de valeurs estimées de *tc* calculées à six températures (5; 10; 15,5; 21, 26,5; 32 °C) (**Figure 2.46**). L'axe 1, qui représente un total de 97 % de la variance, a été positivement corrélé à toutes les températures. L'axe 2, qui représentent uniquement 2 % de la variance totale a été positivement corrélé aux traitements 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C et négativement corrélé au traitement de 5 °C. Les valeurs estimées de *tc* maximale de chaque lot ont été principalement distinguées en fonction de l'axe 1.

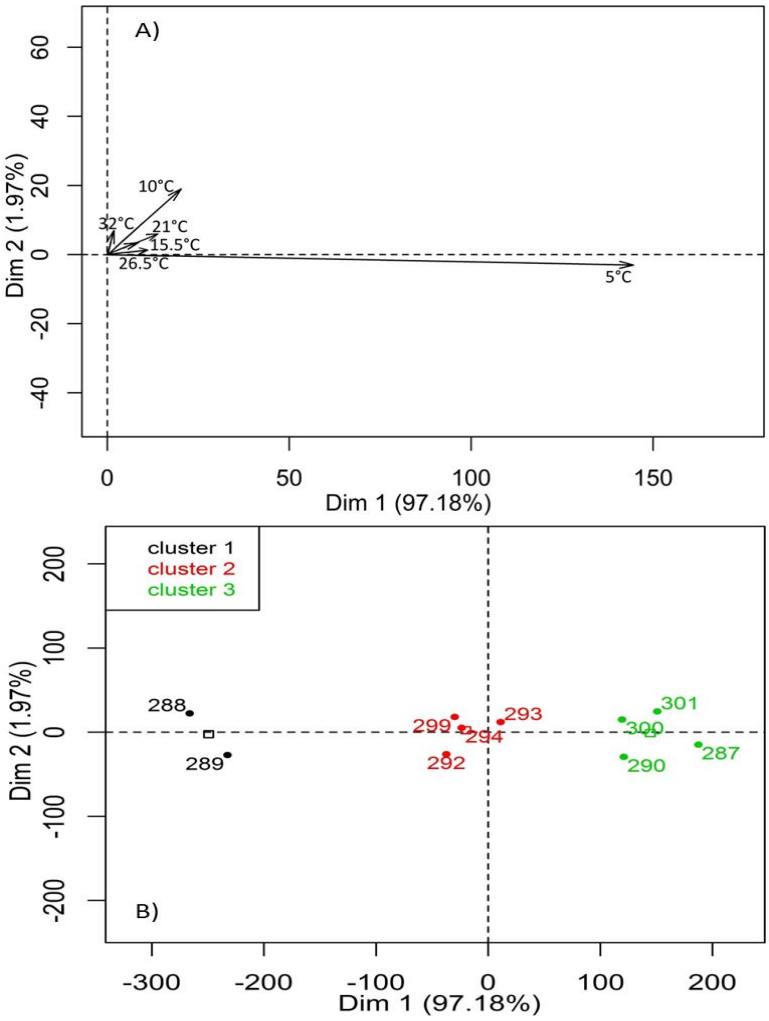


Figure 2.46: Analyse en composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC) calculée sur les valeurs estimées maximales de *tc* à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 10 lots de graines de dactyle. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution et Classification des lots de graines sur les deux premiers axes.

L’analyse HCPC a classé les 10 lots de dactyle en trois groupes sur la base des valeurs estimées de temps initial apparent de germination (*tc*) de chaque lot (**Figure 2.46 B**). Chaque groupe représente un type de courbe de réponse aux températures, en particulier à 5 °C.

La **figure 2.47** a montré qui la valeur estimée de *tc* dans tous les groupes ont presque la même forme. De plus, ils ont montré que la valeur estimée de *tc* diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis augmente un petit peu avec l'augmentation de la température jusqu’à 26,5 °C, ensuite diminue légèrement à 32 °C dans certains cas. Généralement, le temps initial apparent de germination (*tc*) est le plus élevé à 5 °C.

Dans le groupe I, les lots ont une petite valeur estimée de *tc* en comparaison avec d'autres groupes (**Figure 2.47**). Ce sont des lots qui germent très peu de temps après la mise en eaux, y compris à 5 °C.

Les lots dans le groupe II, ont une valeur estimée de *tc* moindre à celui des groupes III et plus élève que le groupe I. De plus, il n'y a pas de grandes différences en la valeur estimée de *tc* entre les températures de 10 jusqu'à 32 °C (**Figure 2.47**).

Dans le groupe III, les lots dans ce groupe ont une forte valeur estimée *tc* dans toutes les températures en comparaison avec les groupes I et II, surtout les traitements à 5 et 10 °C.

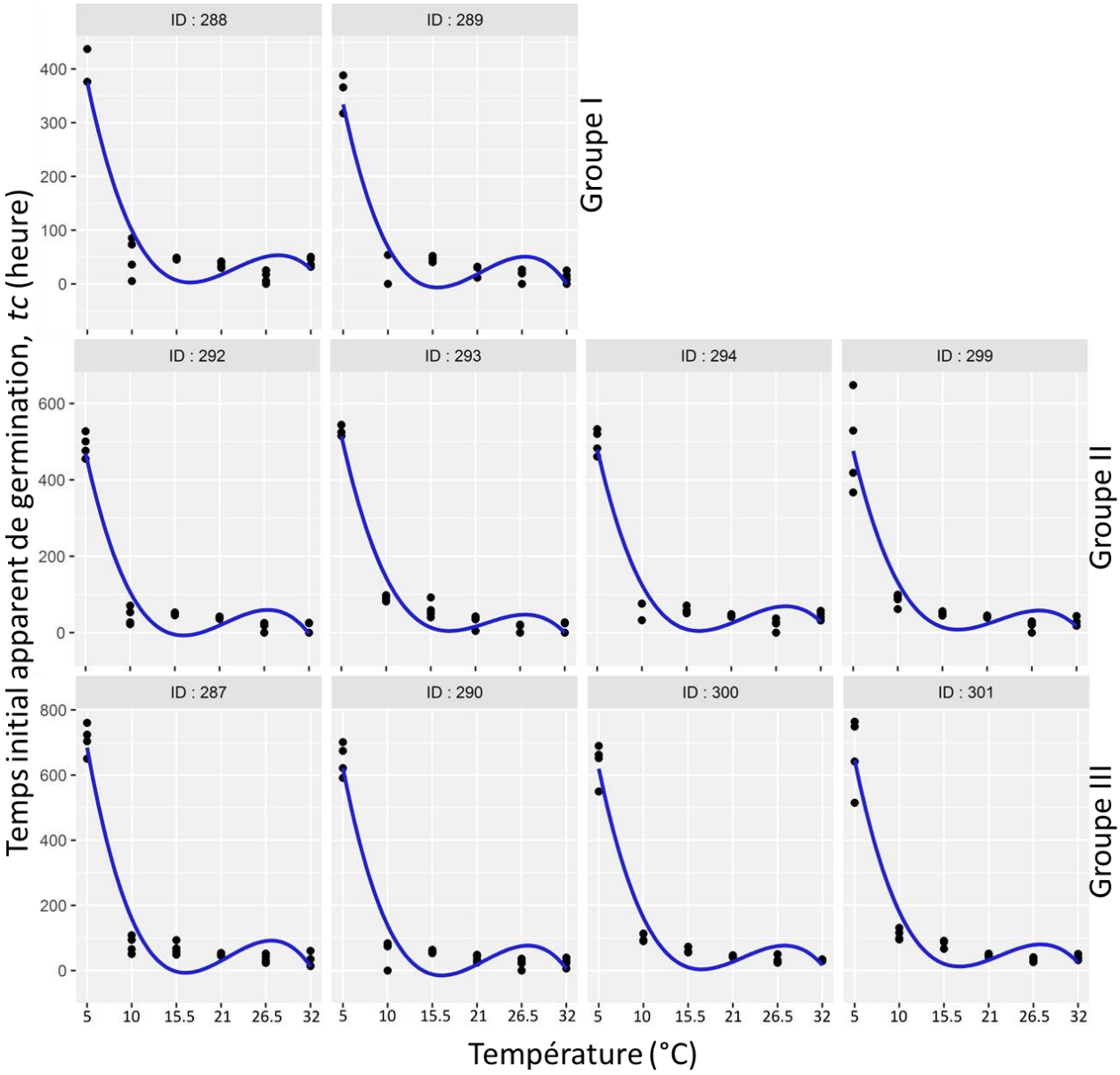


Figure 2.47: Exemples de parangons et de valeurs estimées du temps initial apparent de germination estimés (*tc*) en fonction de la température de lots de graines de dactyle, Des polynômes du troisième degré ont été ajusté pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponses germinatives à la température (Groupes 1-3)

3.3.2.2. Vitesse maximale de germination (α)

Afin de comparer l'effet de la température sur la vitesse maximale de germination (α) entre les lots de dactyle, une ACP a été réalisée sur la valeur estimée d'α qui a été calculée aux six températures (**Figure 2.48**). L'axe 1, qui représente un total de 75 % de variabilité, a été positivement corrélé à toutes les températures sauf le traitement de 5 °C. L'axe 2, qui représente à 15 % de la variabilité a été positivement corrélé aux traitements 10; 15,5; 21 et 26,5 °C et négativement corrélé aux traitements 5 et 32 °C (**Figure 2.48A**). La **figure 2.48B** montre que les lots de dactyle ont été distribués sur l'ensemble du diagramme. La vitesse maximale de germination de chaque lot a été distinguée en fonction de l'axe 1, et la vitesse de germination des traitements dans chaque lot ont été distingués en fonction de l'axe 2.

L'analyse HCPC a classé les 10 lots de graines en trois groupes (**Figure 2.48B**). Cette classification a été effectuée sur i) la valeurs maximale estimée d'α de chaque lot, indépendamment de la températures à laquelle elle est obtenue, et ii) la valeur estimée d'α moyenne pour chacune des températures pour chaque lot. Chaque groupe représente un type de réponse à la température en terme de la vitesse de germination estimée (α).

Dans le groupe III, les courbes de valeurs estimées α ont montré que les vitesses de germinations augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminuent quelque peu avec l'augmentation de la température (**Figure 2.49**). Généralement, les lots dans ce groupe ont une vitesse de germination estimée (α) plus rapide à 32 °C que celle du groupe II

Les différents types de courbes de la vitesse maximale de germination (α) en réponse à la température, qui ont été observés entre les groupes (**Figure 2.49**), reflètent la variabilité génétique existant au sein de l'espèce *Dactylis glomerata* L.

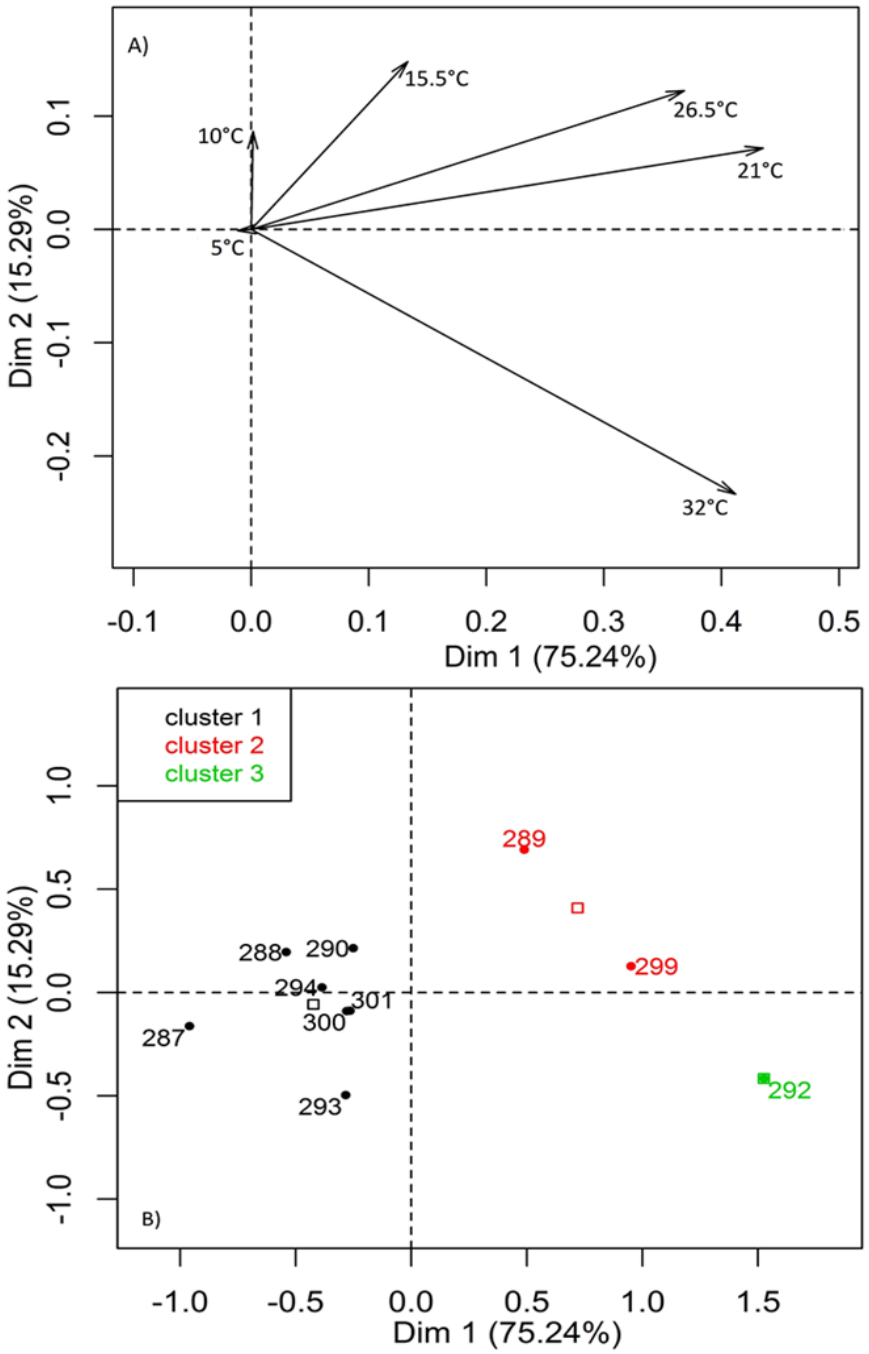


Figure 2.48: Analyse en composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC) calculée sur la vitesse maximale de germination estimée (α) à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 10 lots de graines de dactyle. A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution et Classification des lots de graines sur les deux premiers axes.

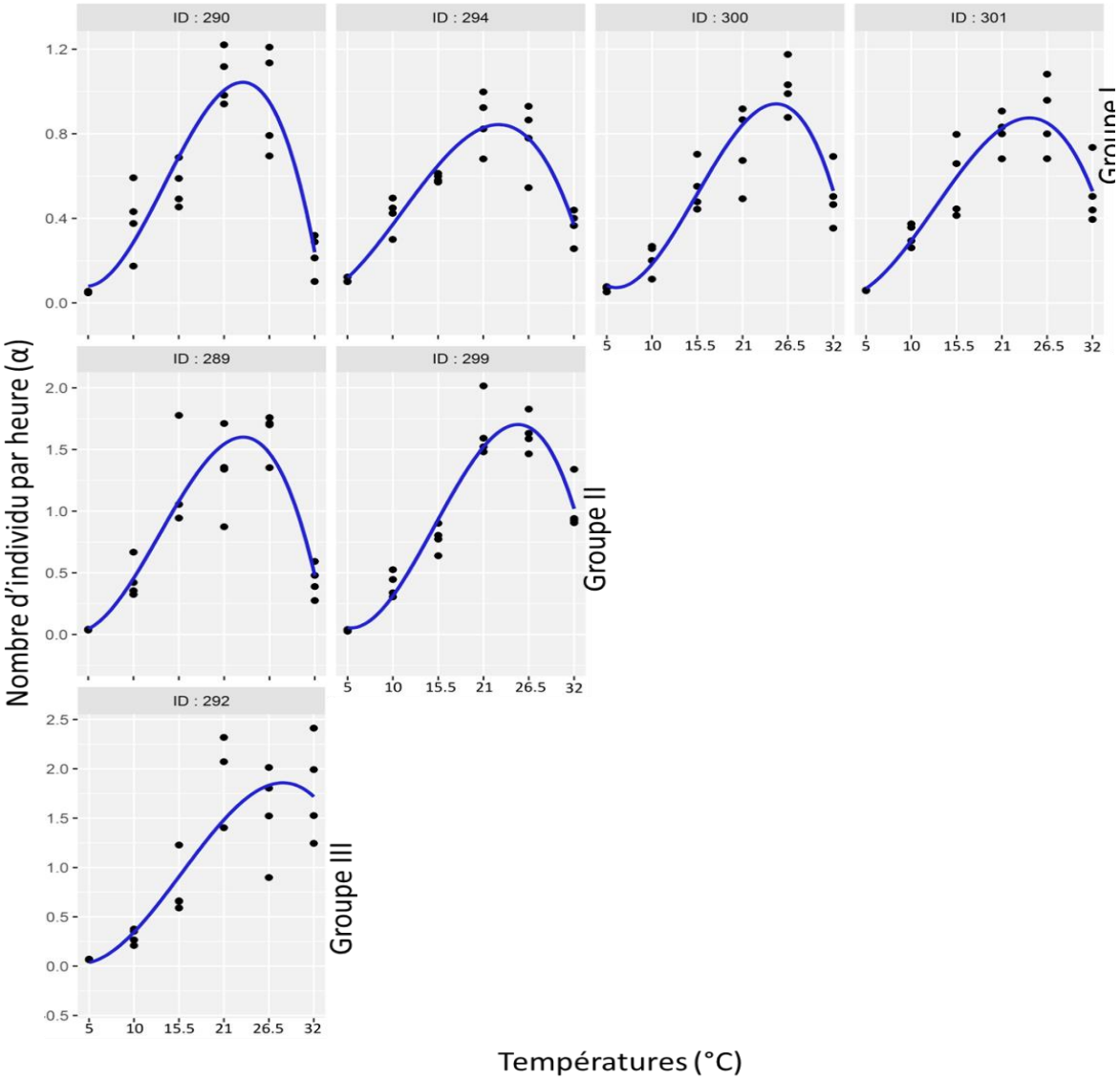


Figure 2.49: Exemples de parangons et de valeurs estimées de la vitesse maximale de germination estimés (α) en fonction de la température de lots de graines de dactyle, Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponses germinatives à la température (Groupes 1-3)

3.3.2.3. Temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$)

La variabilité entre les lots de dactyle a été illustrée par une ACP calculée sur le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$) à six températures (5; 10; 15,5; 21, 26,5; 32 °C) (**Figure 2.50**). Les deux premiers axes représentent un total de 96 % de la variation. L'axe 1, qui explique 75 % de la variation, a été positivement corrélé avec les traitements de 5 et 10 °C et négativement corrélé avec les traitements de 15,5; 21; 26,5 et 32 °C. L'axe 2, qui montre 21 % de la variance totale, a été positivement corrélé avec les traitements de 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C et négativement corrélé au traitement 5 °C. Les lots de fétuque élevée ont été distribués sur l'ensemble du diagramme. Le $t_{95\%}$ de chaque lot a été distingué en fonction de l'axe 1, et le $t_{95\%}$ de chaque traitement dans chaque lot a été

distingué en fonction de l'axe 2 (**Figure 2.50B**). On déduit de cette analyse qu'il y avait une forte variabilité dans le temps requis pour atteindre 95 % de la germination finale entre les lots de graines du dactyle en réponse à la température surtout à 5 et 10 °C.

Ensuite, l'analyse HCPC a classé les 10 lots de graines du dactyle en quatre groupes (**Figure 2.50B**). Cette classification était basée sur le $t_{95\%}$ en réponse aux températures. Chaque groupe représente un type de l'effet des températures sur le temps nécessaire pour atteindre 95 % de la germination finale.

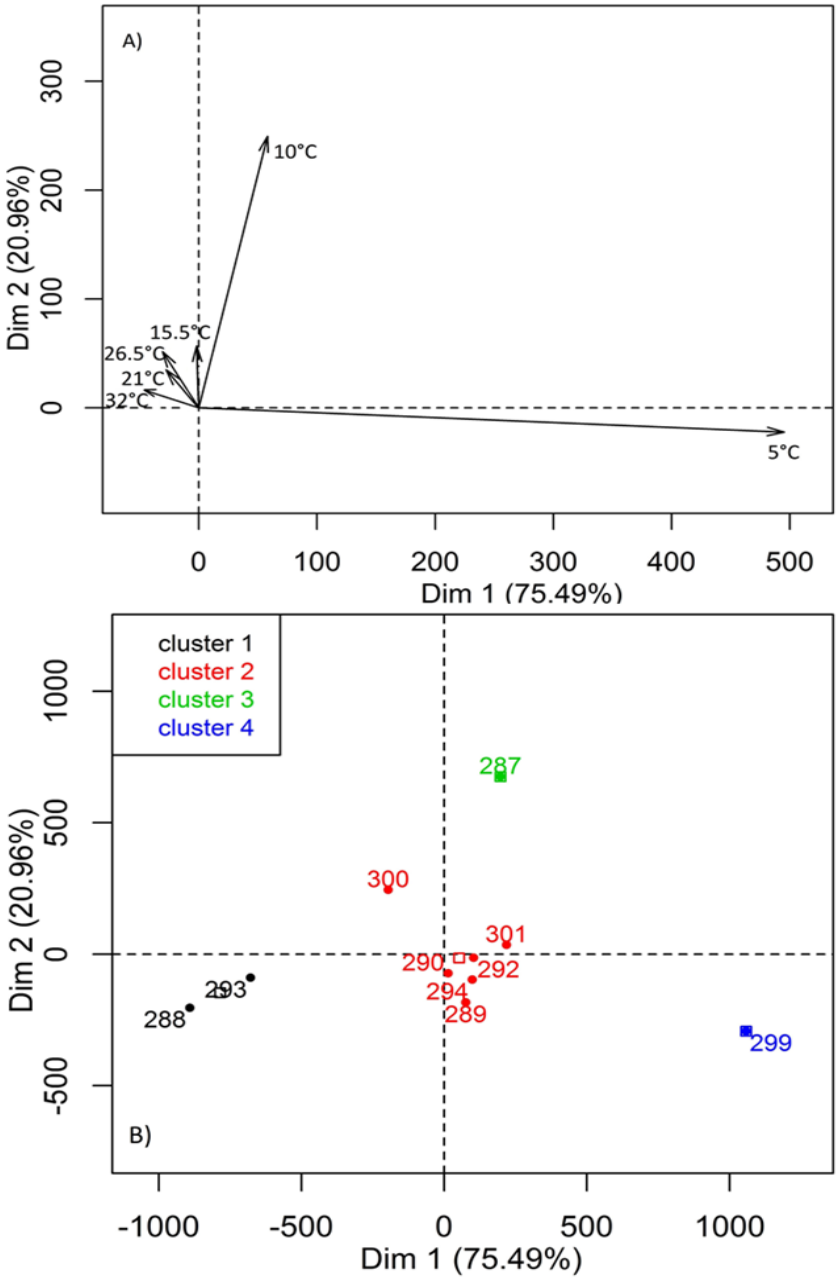


Figure 2.50**:** Analyse en composantes principales (ACP) et du regroupement hiérarchique des composantes principales (HCPC) calculée sur le temps à 95 % de germination finale à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 10 lots de graines de dactyle**.** A) Contribution des températures aux deux premiers axes. B) Distribution et Classification des lots de graines sur les deux premiers axes.

La **figure 2.51** a montré que les courbes de valeurs estimées $t_{95\%}$ diminuent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis augmentent jusqu'à

26,5 °C, ensuite restent constante ou diminuent quelque peu à 32 °C. Généralement, $t_{95\%}$ est le plus élevé à 5 °C

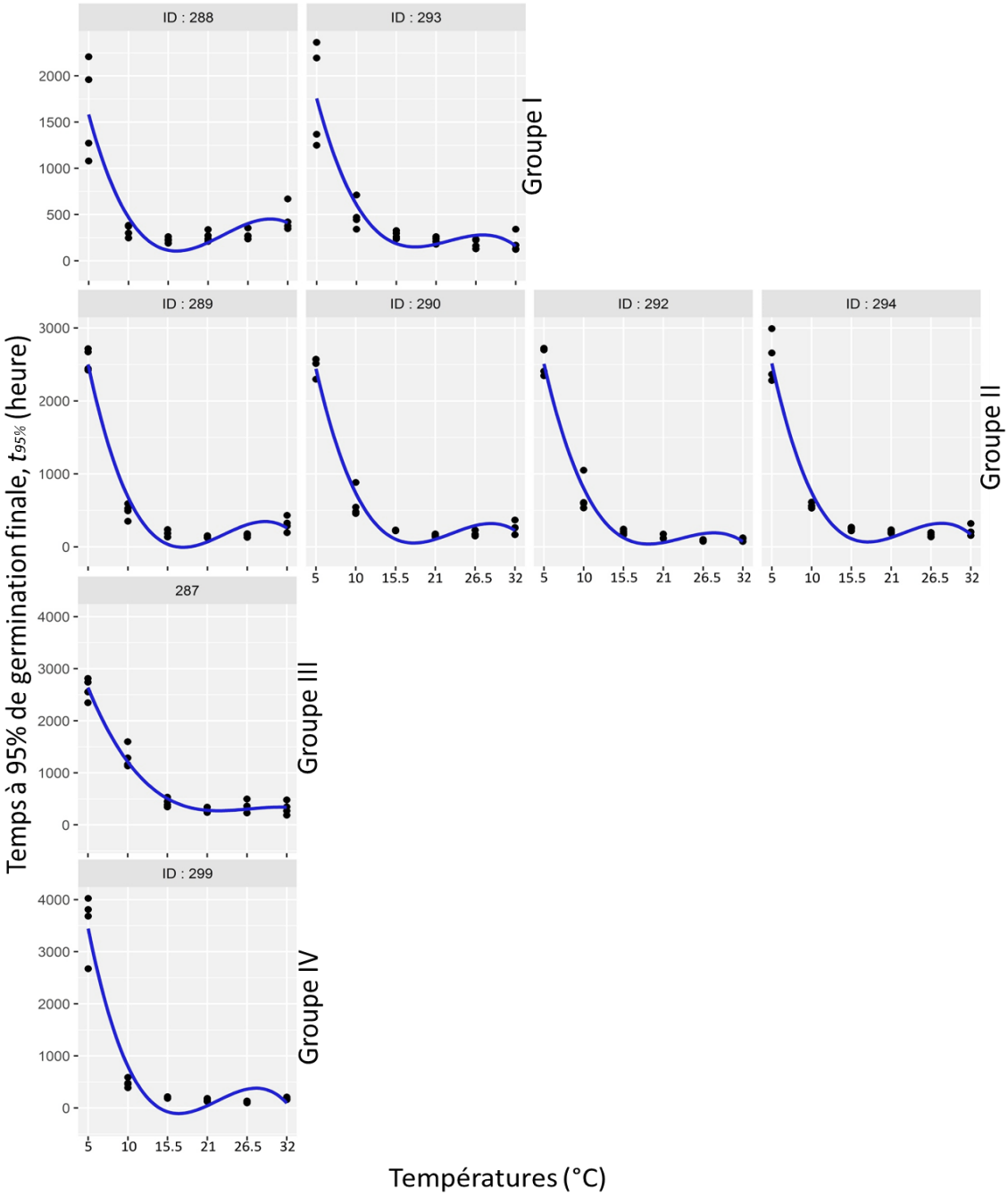


Figure 2.51: Exemples de parangons et de valeurs estimées du temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) en fonction de la température de lots de graines de dactyle, Des polynômes du troisième degré ont été ajustés pour l'ensemble des données de chaque lot. On illustre les trois différents types de réponses germinatives à la température (Groupes 1-4)

Dans le groupe I, les lots ont une petite valeur estimée de $t_{95\%}$ en comparaison avec d'autres groupes. En général, les lots dans ce groupe requièrent moins de temps pour atteindre 95 % de la germination finale que les autres groupes, notamment à 5 °C (**Figure 2.51**).

Les lots dans le groupe II ont une valeur estimée de $t_{95\%}$ plus élevée que le groupe I et inférieure à celui des groupes III et IV. Aussi, il n'y a pas de grandes différences en valeur estimée de $t_{95\%}$ entre les températures de 15,5 à 32 °C (**Figure 2.51**).

Dans le groupe III, les lots ont une grande valeur estimée de $t_{95\%}$ pour toutes les températures en comparaison avec les groupes II et III. De plus, les valeurs estimées $t_{95\%}$ diminuent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis restent constantes jusqu'à 32 °C (**Figure 2.51**).

Dans le groupe IV, les lots ont une grande valeur estimée de $t_{95\%}$ plus élevée à toutes les températures en comparaison avec d'autres groupes, notamment à 5 °C (**Figure 2.51**).

3.3.2.4. Relation entre le temps initial apparent de germination (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$)

Les réponses germinatives aux températures constantes étaient significativement différentes à l'intérieur et entre des lots pour ces deux paramètres. En général, les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ ont diminué lorsque la température a augmenté jusqu'à la température optimale, puis restaient constantes ou augmentent un petit peu avec l'augmentation de la température.

Nous avons posé l'hypothèse qu'il existe une relation linéaire entre le temps initial apparent (*tc*) et le temps à 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) en réponse à température constante de 5 à 35 °C.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la relation entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$ de chaque traitement pour 10 lots de dactyle. Des régressions linéaires significatives ($P \leq 0,05$) ont été ajustées entre les deux variables (**Figure 2.52**). Seul le traitement de 15,5 °C, avait une relation linéaire significative entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$.

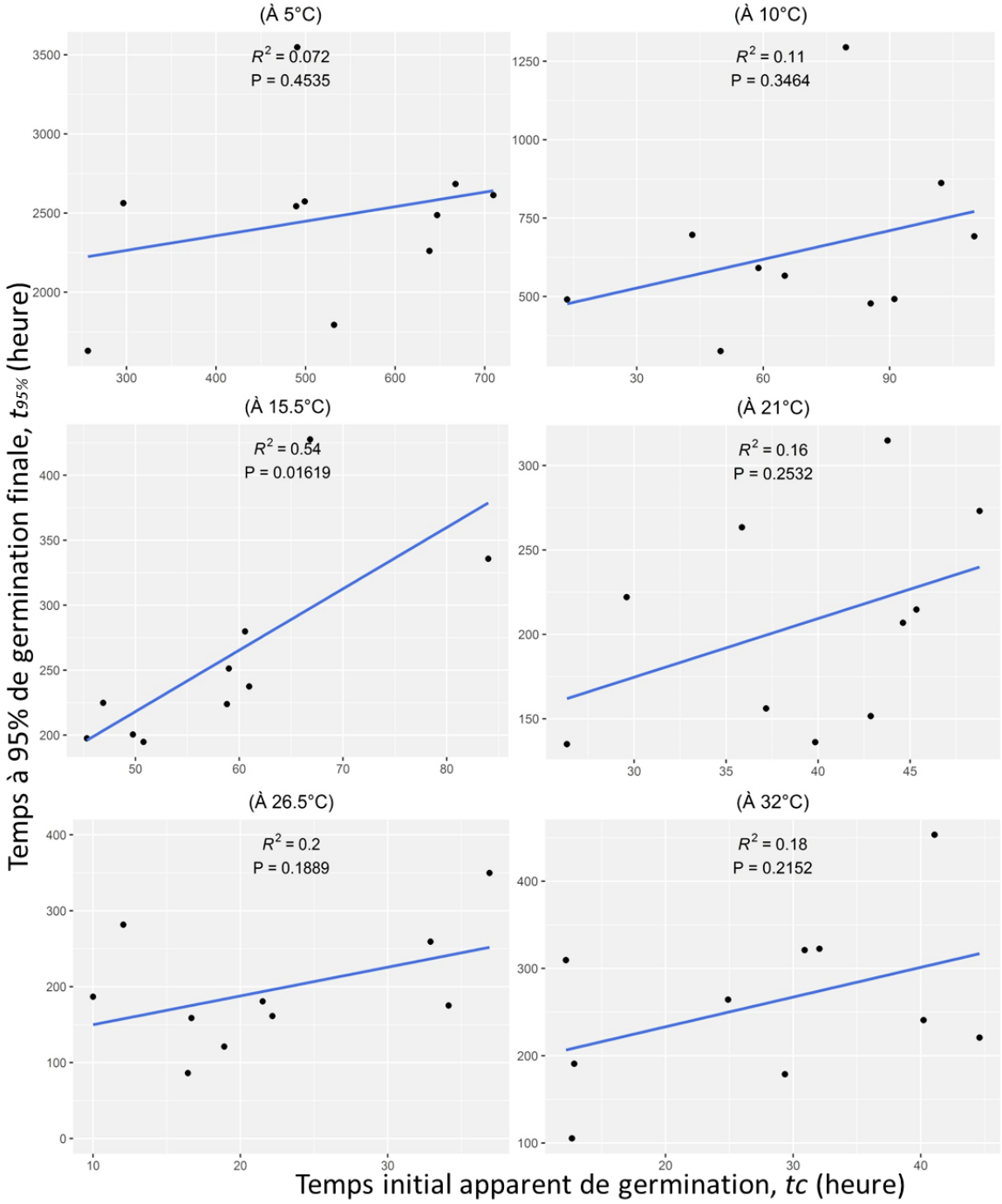


Figure 2.56: Relation entre les valeurs estimées de *tc* et les valeurs estimées de $t_{95\%}$, à six températures (5; 10; 15,5; 21; 26,5 et 32 °C) de 10 lots de graines de dactyle.

3.4. Analyse de la diversité génétique de la germination en réponse à la température de *Triticum aestivum* L. et *Hordeum vulgare* L.

Afin de comparer l'effet de la température sur la capacité germinative entre les espèces de graminées fourragères pérennes et de graminées annuelles (domestiquées), Quatre-vingt-six lots de graines de deux espèces domestiquées ont été inclus dans ce travail. Nous avons étudié soixante-deux lots de blé et vingt-quatre lots d'orge.

Pour chaque lot, des graphiques de type boîtes à moustaches ont été faits pour chaque ensemble de données en fonction des températures de germination (Annexe 2.4 et 2. 5).

Pour les lots de graines de blé, les graphiques montrent qu'il avait une forte capacité germinative à toutes les températures. Aucune différence significative entre les effets des traitements a été détectée (**Figure 2.57**).

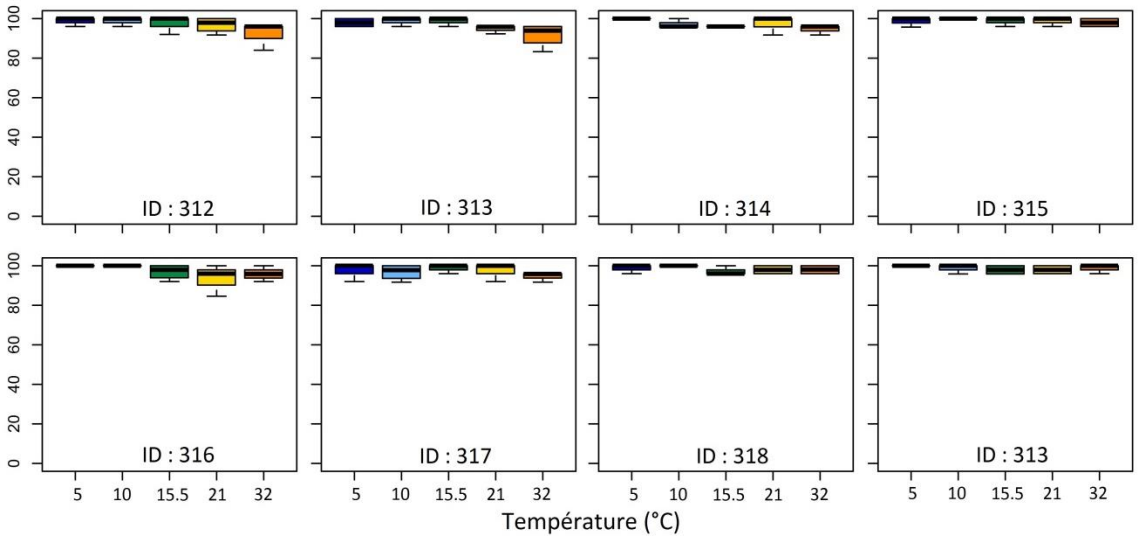


Figure 2.57: Quelques exemples de boîtes à moustaches des lots de graines de blé, les pourcentages de germination observés en fonction de la température (5; 10; 15,5; 21 et 32 °C).

Les lots de graines d'orge ont une forte capacité germinative pour les traitements de 5 à 21 °C dans la plupart des cas (**Figure 2.58**). De plus, ils ont une faible capacité germinative à 32 °C par comparaison à d'autres traitements.

Généralement, les graines de ces deux espèces ont une forte capacité germinative à toutes les températures et ils ont une grande vitesse de germination en comparaison avec les espèces graminées fourragères pérennes étudiées.

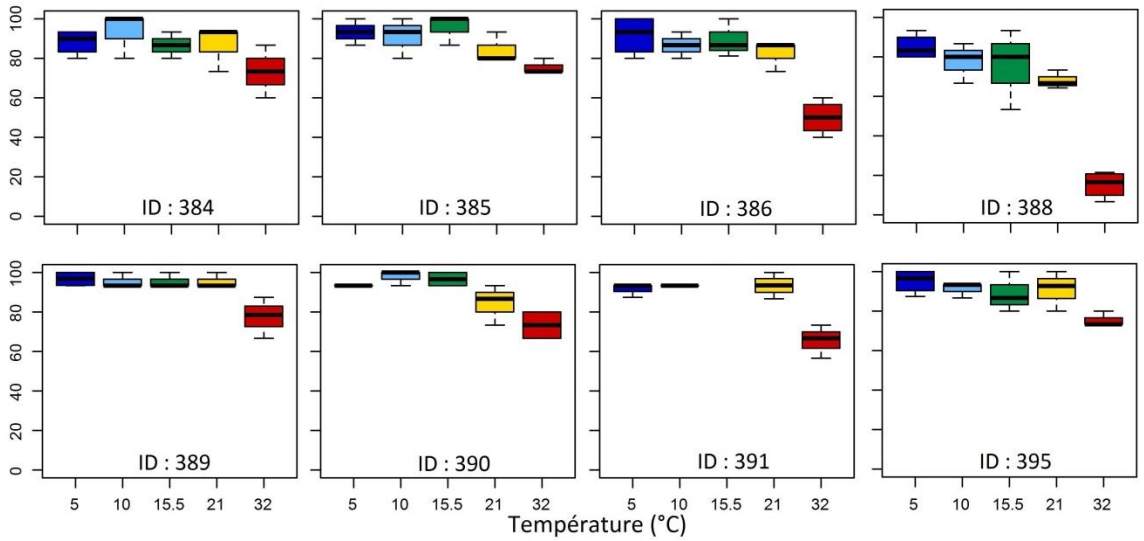


Figure 2.58: Exemples de boîtes à moustaches des lots de graines d'orge, les pourcentages de germination observés en fonction de la température (5; 10; 15,5; 21 et 32 °C).

4. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons évalué les effets de la température sur une large gamme de lots de graines sauvages et de variétés de *Lolium perenne* L. et *Festuca arundinacea* Schreb., en plus d'un petit nombre de lots de *Dactylis glomerata* L.

La germination est un processus biologique complexe influencé par des facteurs génétiques et environnementaux, telle que la température. Il est reconnu depuis longtemps que la germination de graines se caractérise par des températures minimales, optimales et maximales (Bewley and Black, 1994). Chaque espèce a sa gamme de températures optimales pour la germination.

Les résultats de notre étude indiquent que de la diversité génétique existe dans la capacité germinative en réponses aux températures constantes entre 5 et 32 °C. De plus, les courbes de réponse aux températures sont différentes et reflètent la variabilité génétique qui existe entre les lots de chaque espèce.

Dans cette étude, nous avons distingué différents types de réponses à la température, comme le montrent les **figures 2.8**, **2.30** et **2.46**. Nombre de lots de graines de ray-grass ont montré que le pourcentage de germination augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminue avec l'augmentation de la température. Ceci est compatible avec les résultats qui ont montré que le nombre de graines germées augmentait quand la température augmentait de 5 à 15 °C pour des espèces de prairies de zone tempérée (Butler et al., 2017; Sharifiamina et al., 2016; Moot et al., 2000).

Plusieurs lots de graines de trois espèces fourragères ont présenté une augmentation du pourcentage de germination maximale avec l'augmentation de la température jusqu'à une plage de température optimale. Ce pourcentage diminuait ensuit avec l'augmentation de la température. Les pourcentages de germination de certaines espèces de prairies tempérées augmentaient avec l'augmentation de la température jusqu'à 30 °C, puis restaient constant ou diminuaient légèrement (Larsen and Bibby, 2005; Monks et al., 2009; Palazzo and Brar, 1997; Zhang et al., 2015). Dans d'autres cas, des lots de graines de ray-grass ont montré que le pourcentage de germination augmentait avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale puis restaient constants jusqu'à 32 °C.

De plus, pour certains lots de graines dans nos trois espèces prairiales, la température optimale de germination n'est pas une seule température, mais une plage de températures. Ceci est compatible avec ce qui est rapporté par Monks et al., (2009) pour le ray-grass et la fétuque élevée, et par Turner et al., (2001) pour *L. rigidum* et par (Hill et al., 1985) pour *L.*

multiflorum. Dans plusieurs lots de graines de ray-grass, il n'y avait pas de différences significatives de pourcentage de germination entre les températures. Le pourcentage final de germination a été peu affecté par la température, ce qui indique que la température de base pour la germination est relativement constante au sein des populations (Larsen and Bibby, 2005).

Nombre de lots de fétuque élevée ont montré que le pourcentage de germination diminue à 10 °C puis augmente avec l'augmentation de la température, par exemple, le lot 006 avait un pourcentage final de germination de 88 % à 5 °C, mais il a chuté jusqu'à 60% à 10 °C, puis augmenté jusqu'à 90 % à 15,5 °C. Certains chercheurs ont montré que pour quelques espèces, le pourcentage final de germination chutait à une température spécifique, puis augmentait pour atteindre la température optimale (Monks et al., 2009; Nori et al., 2014; Richardson et al., 2018).

Le temps de début de germination et la vitesse de germination pourraient être importants pour semer plus tôt afin de favoriser l'établissement des plantes. Dans ce travail, la température a eu un effet marqué sur le temps de début de germination (*tc*) et sur la vitesse de germination (α et $t_{95\%}$).

On déduit de cette analyse, qu'il y avait une différence marquée entre les lots de chaque espèce au temps initial apparent (*tc*), notamment dans le traitement 5 et 10 °C. En général, les valeurs estimées de *tc* ont fortement diminué avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis légèrement augmenté à 32 °C (p. ex.: **figure 2.20, 2.41 et 2.55**). Nous trouvons dans la littérature au moins deux travaux avec des résultats similaires aux nôtres. Le temps de germination a été diminué avec l'augmentation de la température de 5 à 30 °C pour des cultivars Festuca (Palazzo et Brar, 1997). Le temps de germination des espèces et cultivars de gazon a été réduit lorsque la température augmentait de 8 à 24 ° C (Larsen and Bibby, 2005).

Dans cette étude, les courbes de valeurs estimées de α ont montré que les valeurs augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis diminuent fortement avec l'augmentation de la température. En plus de la variabilité entre les lots de chaque espèce pour la vitesse maximale de germination (α) à chaque température, des différences existent à la température optimale et aux températures défavorables 5 et 35 °C (p. ex.: **figure 2.14**, **2.35** et **2.49**). La vitesse de germination des espèces de trèfle et de fétuque montre une tendance linéaire positive de la température minimale à la température optimale, puis une baisse linéaire négative avec l'augmentation

de la température (JG and JFL, 1987; Lonati et al., 2009; Nori et al., 2014). La vitesse de germination de raygrass augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale puis reste constante (Moot et al., 2000). De plus, dans cette étude, dans certains cas la vitesse de germination atteint un plateau, alors que les valeurs estimées de α n'étaient pas significativement différentes entre les températures. (Zhang et al., 2013) ont également constaté ce phénomène : la vitesse de germination du ray-grass et de la fétuque élevée ont atteint un plateau avec une plage entre 3 et 12 °C.

Le temps requis pour atteindre 95 % de germination finale ($t_{95\%}$) dans les lots des trois espèces de graminées fourragères pérennes , diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis reste constant, mais dans d'autres cas, les valeurs estimées de $t_{95\%}$ diminuent fortement avec l'augmentation de la température jusqu'à la température optimale, puis augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à 26,5 °C, ensuite diminuent à 32 °C (p. ex.: **figure 2.17**, **2.38** et **2.52**). Ceci est compatible avec ce qui est rapporté par (Monks et al., 2009; Moot et al., 2000). Pour le ray-grass le temps requis pour atteindre 75 % de germination finale augmente de 4 à 10 °C mais est ensuite constant à 30 °C et diminue jusqu'à zéro à 35 °C.

De plus, les différences sur les paramètres liés à la vitesse de germination et au temps (α, *tc* et $t_{95\%}$) et le pourcentage de germination finale en réponse aux températures de 5 à 32 °C, reflètent la variabilité génétique qui existe entre les lots de chaque espèce.

Chapitre III :

Effet de la conservation des lots de graines sur leur réponse germinative à la température

1. INTRODUCTION

Le stockage des semences comme germoplasme hors site est une étape essentielle pour la conservation à long terme des ressources génétiques. Les banques de graines sont maintenant largement utilisées pour la conservation hors site des espèces de plantes sauvages. Il y a plus de 1750 banques de graines dans le monde pour la conservation hors site de la diversité végétale. Il est estimé qu'environ 7,4 millions d'accessions sont actuellement maintenues au niveau mondiale (FAO, 2010). Un problème couramment rencontré pour la gestion est la méconnaissance du temps de conservation des graines hors site sans perte significative de viabilité et comment les intervalles de surveillance peuvent être optimisés (Ellis et al., 2017, 2018; Van Treuren et al., 2013; Walters et al., 2005). Le protocole ou le moyen de stockage inapproprié entraîne souvent, une détérioration des graines, une perte de viabilité et une faible germination des graines, qui sont des phénomènes naturels pendant le stockage (Ali et al., 2015; Nasreen, 2002). Les standards de gestion des banques de graines recommandent une température de -18 ± 3 °C pour le stockage à long terme des collection de base et de 5 - 10 °C pour le stockage à moyen terme de la collection active (FAO, 2013).

L'aspect le plus important de la conservation du matériel génétique est le maintien de l'intégrité génétique des populations pendant le stockage (E.L. BREESE, 1989; Roos, 1984). Il existe une relation étroite entre la perte de viabilité des graines pendant le stockage et l'accumulation de dommages génétiques dans les graines survivantes (Murata, 1991). La teneur en humidité des graines, la température et les périodes de stockage, comptent parmi les principaux facteurs affectant la relation ci-dessus (Garoma et al., 2017; Reed, 2005; van Treuren et al., 2018). Ainsi, ces facteurs influent sur la longévité des graines pendant le stockage (Onyekwelu and Fayose, 2007; Pradhan and Badola, 2008, 2012).

L'objectif de ce chapitre était d'étudier les effets du temps et du lieu de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal et tests de germination

Dans cette étude, 94 lots appartenant à 47 accessions de *Lolium perenne L*. ont été évalués (Tableau 1 et 2).

Les graines ont été obtenues au Centre de ressources biologiques des espèces fourragères et à gazon (CRB), URP3F, Inra de Lusignan. Toutes les graines ont été stockées à l'obscurité, à 5 °C et 30 % d'humidité relative.

Pour le test de germination, le protocole expérimental et les traitements de température sont ceux décrits dans le premier chapitre.

2.2. Ajustement des courbes et analyses statistiques

Pour chaque lot, les pourcentages de germination maximale observée dans les quatre répétitions ont été regroupés et représentés en fonction de la température, puis des polynômes de troisième degré ont été ajustés à l'ensemble des données par lot.

Pour la comparaison entre les deux lots de chaque accession, il était nécessaire d'utiliser une analyse statistique capable de comparer la forme des courbes de réponses de chaque lot. Pour cette raison, nous avons utilisé différentes méthodes d'analyse de variances. Après l'ajustement de la courbe, des comparaisons ont été effectuées entre le meilleur ajustement d'un lot et les données de l'autre lot de la même accession et réciproquement, comme le montre les **Figure 3.1** et **Figure 3.3**. À cette fin, différents tests ont été effectués.

2.2.1. Normalité des résidus

Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour tester la normalité des résidus du "best-fit" (résidus issus du meilleur ajustement statistique des données du lot) et du "cross-fit" (résidus des données d'un lot et le meilleur ajustement d'un autre lot) de chaque accession.

Le test de Student a été utilisé pour vérifier que la moyenne des résidus de chaque ajustement était égale à zéro.

L'histogramme des résidus permet de visualiser la similarité à une distribution normale avec une moyenne autour de zéro.

2.2.2. Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S test):

Nous avons utilisé le test de K-S pour comparer entre le meilleur ajustement de deux lots différents appartenant à la même accession. Ce test permet d'estimer si le caractère d'un échantillon est distribué de façon comparable à celui d'un autre ou s'il peut être

approximé par une loi de probabilité connue. Notamment, il donne une indication de l'ajustement à une loi normale. La statistique du test s'écrit :

$$d = max|F_A\,(X) - \ F_B\,(X)|$$

Où *d* la variable aléatoire qui prend la valeur de $F_k(X)$ qui est la fonction de distribution de la variable *X* dans la sous population à l'échantillon *k*.

2.2.3. Test de Nash-Sutcliffe efficiency (NSE):

Nous avons utilisé ce test pour comparer entre le meilleur ajustement d'un lot donné et les données d'un autre lot. Le test de NSE, est une statistique normalisée qui détermine l'ampleur relative de la variance résiduelle par rapport à la variance des données mesurées (Nash and Sutcliffe, 1970). La statistique du test s'écrit :

$$\mathrm{NSE} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(X_{obs,i} - X_{model})^2}{\sum_{i=1}^{n}(X_{obs,i} - \bar{X}_{obs})^2}$$

Où X_{obs} est les valeurs observées et X_{model} les valeurs modélisées au moment / lieu i.
NSE étant la valeur optimale et les valeurs comprises entre 0.0 et 1.0 sont généralement considérées comme des niveaux de performance acceptables, tandis que les valeurs <0.0 indiquent que la valeur moyenne observée est un meilleur prédicteur que la valeur simulée, ce qui indique une performance inacceptable.

3. RÉSULTATS

3.1. Effets du temps de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température

L'étude de l'effet du temps de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température pendant la germination a été effectuée sur trente-quatre accessions de ray-grass anglais, pour deux lots de graines par accession, chaque lot a été stocké pour différentes périodes dans le même endroit, dans les mêmes conditions de stockage (Tableau 3. 1). Pour le test de germination, les traitements étaient à 5, 10, 15.5, 21, 26.5 et 32 ˚C comme il a été décrit dans le premier chapitre. À partir de trente-quatre accessions, nous excluons les accessions avec un pourcentage de germination maximale inférieure à 20 % à n'importe quelle température. Pour chaque lot, les pourcentages de germination maximale observés dans les quatre répétitions ont été regroupés et représentés en fonction de la température, puis un polynôme du troisième degré a été ajusté à chaque ensemble de données (**Figure 3.1**). Toutes les graines ont été stockées à l'obscurité, à 5 °C et 30 % l'humidité relative.

Comme décrit dans la première partie, des comparaisons du pourcentage de germination en réponse aux températures entre les lots de graines ont été effectuées sur la base de différentes méthodes d'analyse des variances.

Les tests de normalité des résidus et l'histogramme des résidus, qui ont été fait sur de "best-fit" avec une distribution de "cross-fit" de deux lots de la même accession, montrent que les résidus normalisés se distribuent autour du zéro en cas de "best-fit" pour tous les lots, la **figure 3.4**, montre une allure en cloche de l'histogramme, très semblable à celle de la loi normale et les résidus normalisés se distribuent autour du zéro. Ce qui veut dire que les hypothèses sous-jacents aux analyses de variance étaient validées. Toutefois dans les cas de "cross-fit", on observe qu'il existe une forte différence dans les pourcentages de germination entre les lots de la même accession, car les moyennes des résidus sont différentes de zéro dans les vingt-deux cas (**Figure 3.2**).

À partir des résultats du test de K-S, qui a été utilisé pour comparer entre le meilleur ajustement de deux lots de la même accession, nous avons trouvé des différences significatives ($P < 0.05$) entre les lots de la même accession dans tous les cas.

À partir des résultats du test NSE, nous avons trouvé des différences significatives entre les lots de la même accession dans tous les cas car les valeurs de NSE < 0.0. Alors qu'une

efficacité inférieure à zéro se produit lorsque la moyenne observée d'un lot est un meilleur prédicteur que le meilleur ajustement d'un autre lot.

Enfin, les résultats de différentes méthodes d'analyses qui ont été effectuées sur 22 accessions, prouvaient qu'il existe un fort effet du temps de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température (**Figure 3.1**). Les pourcentages de germination diminuent avec l'augmentation de la durée de stockage des graines.

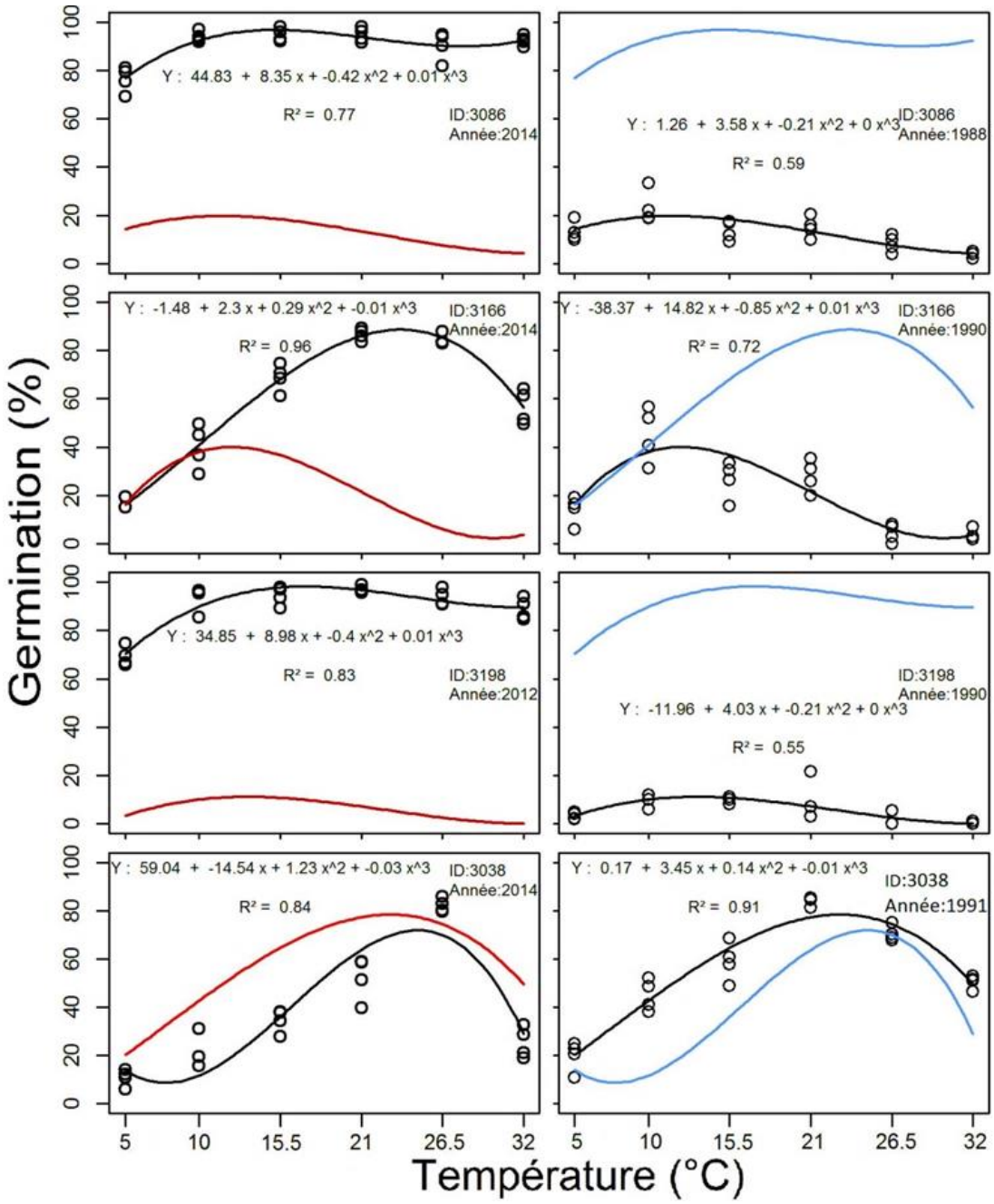


Figure 3.1: Effet de l'âge des lots de graines, pourcentage de germination maximum chez vingt-deux accessions de ray-grass anglais, en réponse aux températures, avec deux lots de graines par accession (l'ancien lot à gauche et le récent lot à droite). La courbe rouge représente la germination maximale ajustée de lot à droite et la courbe bleue représente la germination maximale ajustée de lot à gauche (Suite : trois pages suivantes).

Figure 3.1. Suite

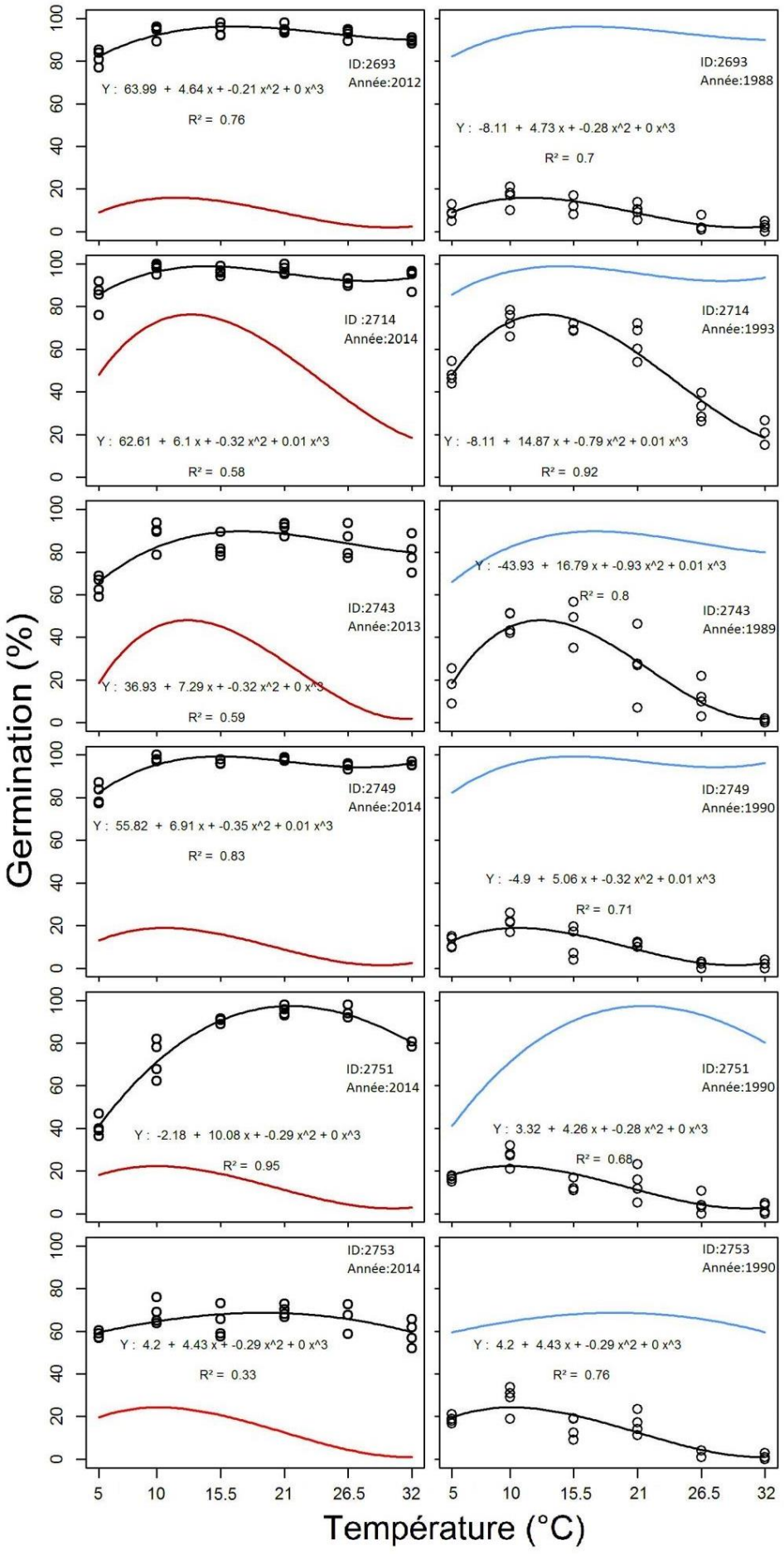


Figure 3.1. Suite

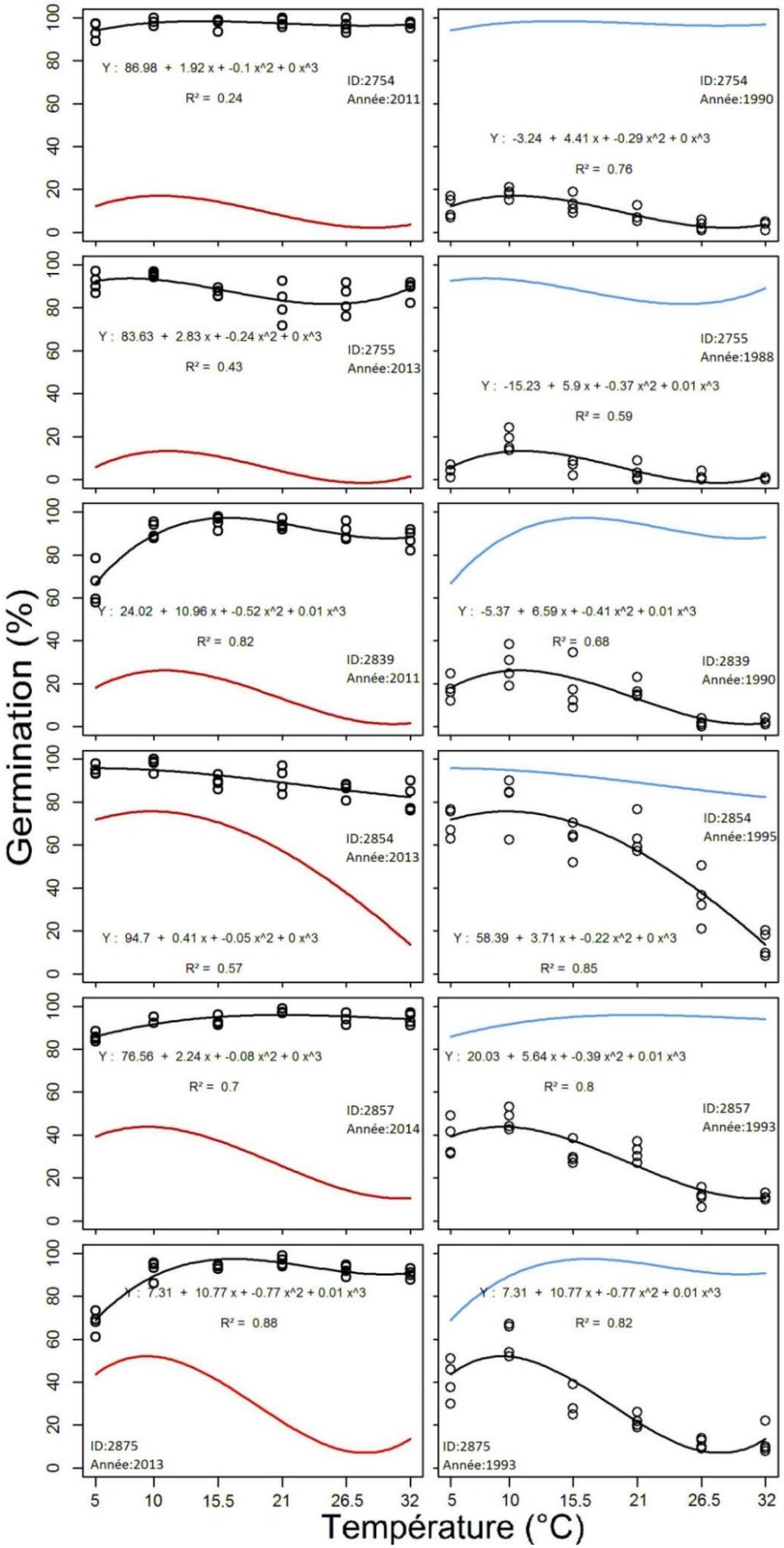
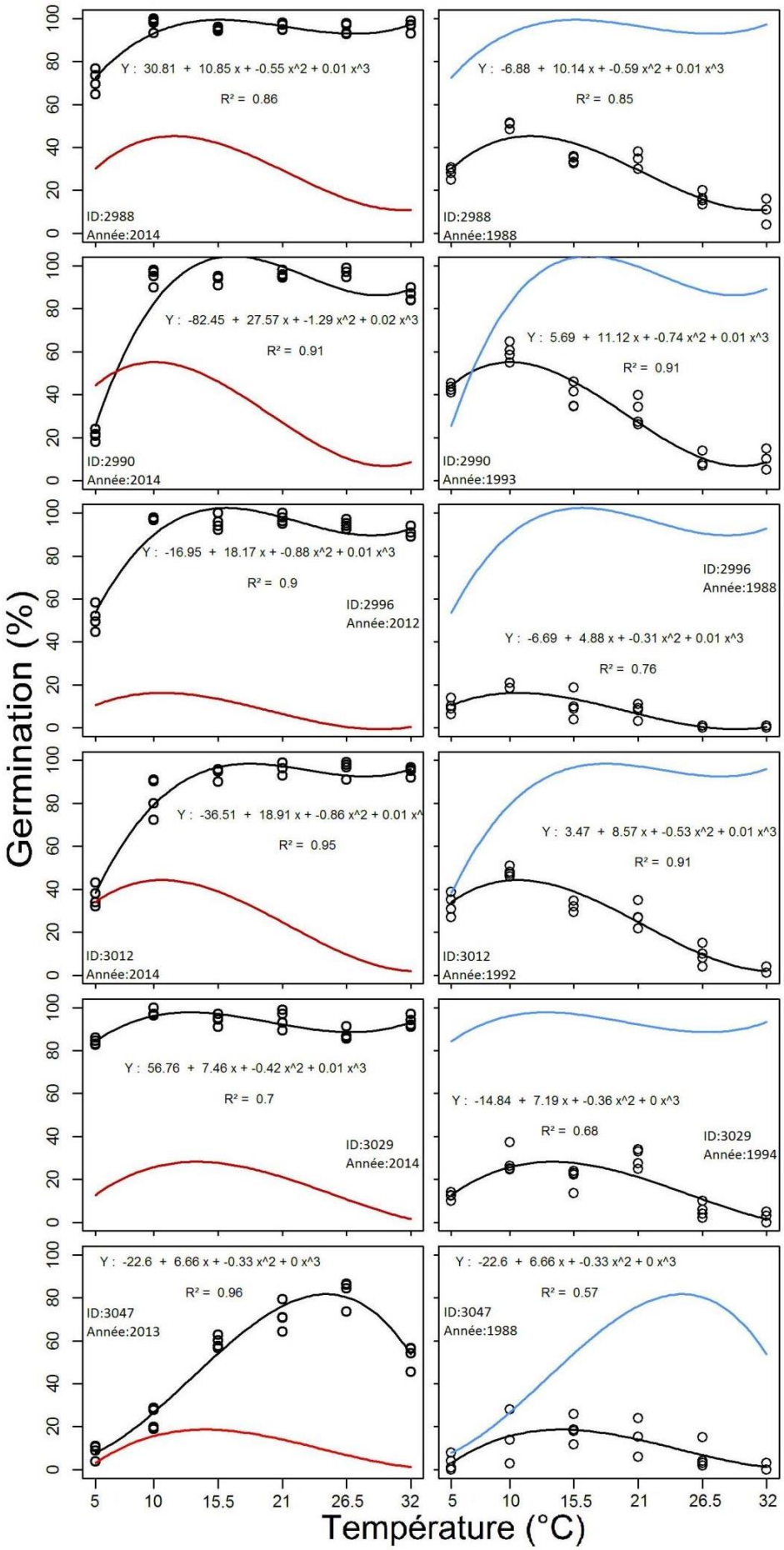


Figure 3.1. Suite



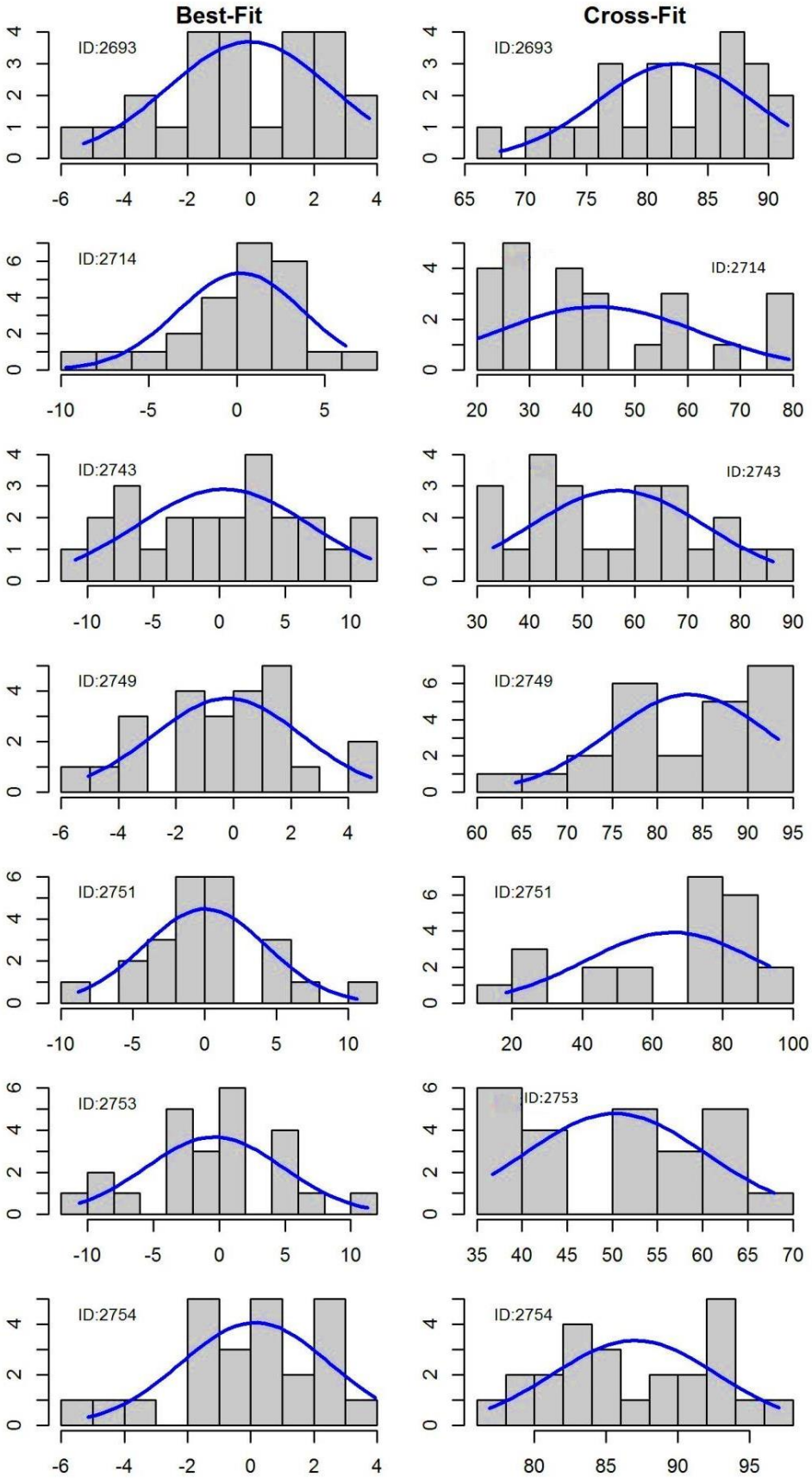


Figure 3.2: histogramme de résidus, comparé entre la distribution du best-fit (résidus des données d'un lot et le meilleur ajustement du même lot) et le cross-fit (résidus des données d'un lot et le meilleur ajustement d'un autre lot) de chaque accession, chez vingt-deux accessions de ray-grass anglais (Suite : deux pages suivantes).

Figure 3.2. Suite

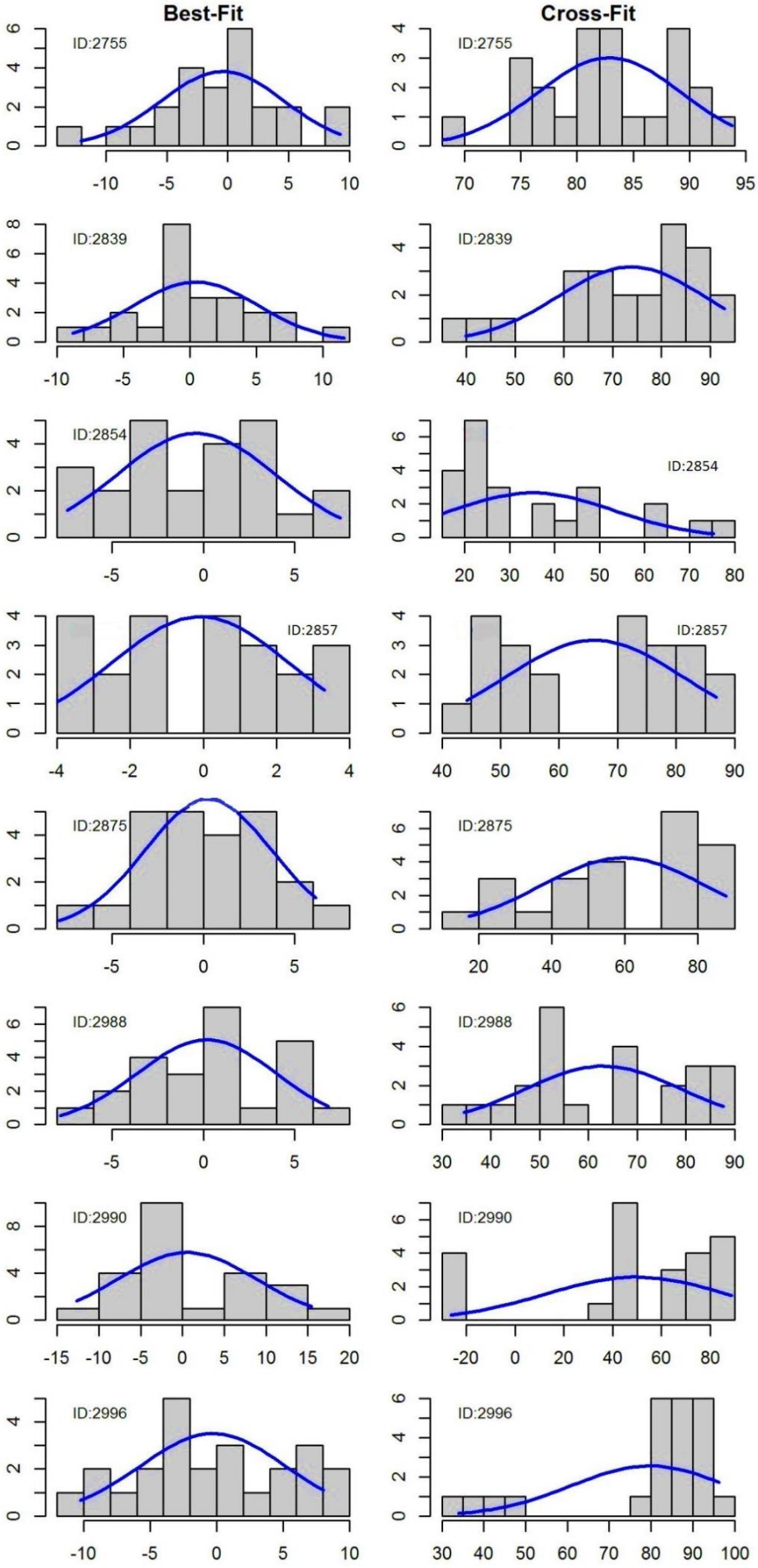
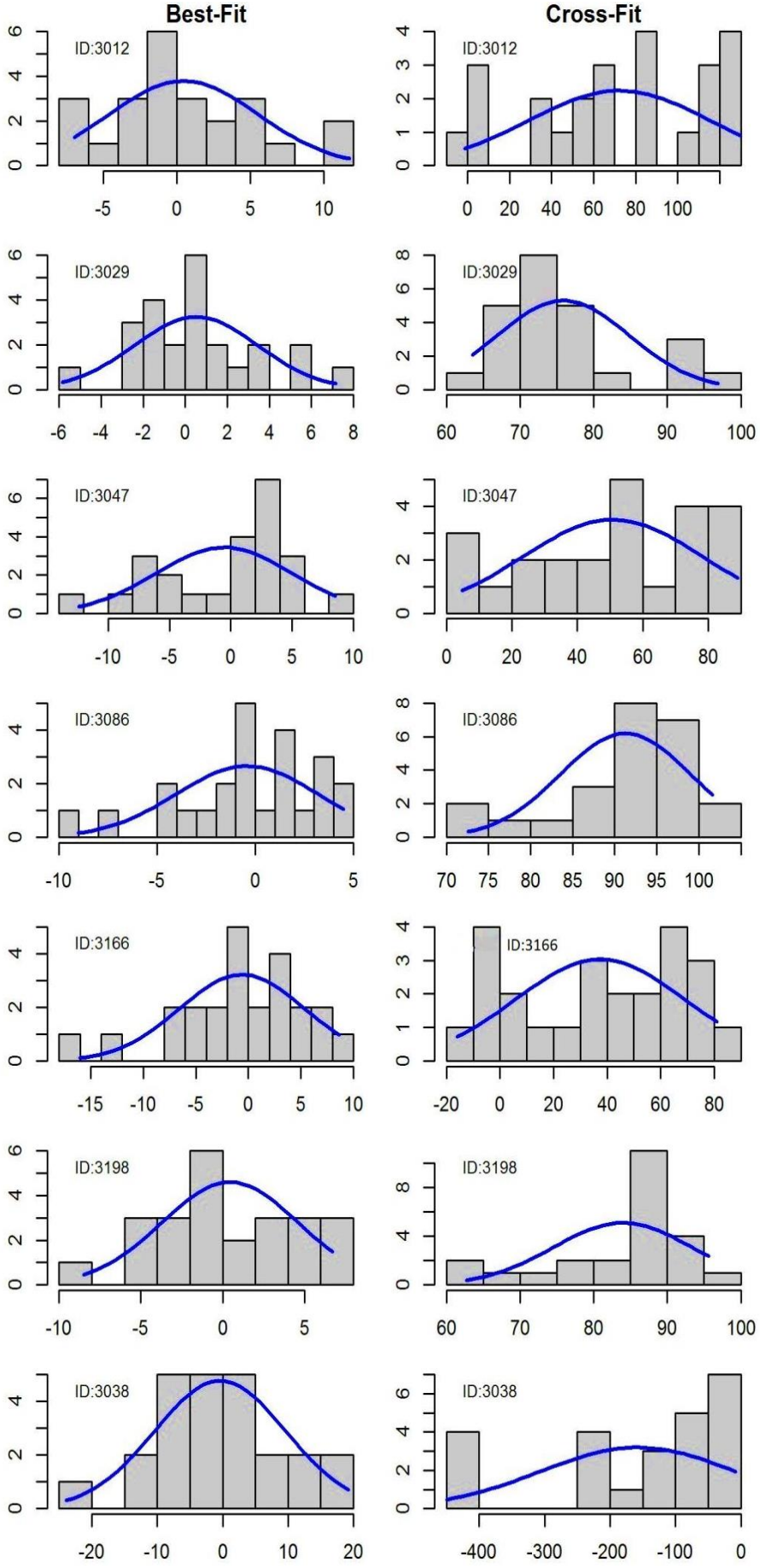


Figure 3.2. Suite



3.2. Effets du lieu de conservation des lots de graines sur la réponse germinative à la température

L'étude de l'effet du lieu de conservation des lots de graines sur la réponse germinative aux températures a été effectuée sur 13 accessions de ray-grass anglais, pour deux lots différents de chaque accession. Chaque lot a été stocké dans un endroit différent, et relativement dans les mêmes conditions de stockage en termes de température et d'humidité (Tableau 3.2).

Après l'ajustement de la courbe de chaque lot (**Figure 3.3**), des comparaisons ont été effectuées entre le meilleur ajustement d'un lot et les données d'un autre lot et par l'inverse. À cette fin, différents tests ont été effectués (La normalité des résidus, le test de K-S et le test NSE).

Comme expliqué précédemment, des comparaisons du pourcentage de germination en réponse aux températures entre les lots ont été effectuées sur la base de différentes méthodes d'analyse des variances, la normalité des résidus, Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S test) et Test de Nash-Sutcliffe efficience (NSE).

Les tests de normalité des résidus et l'histogramme des résidus, qui a été effectué sur de "best-fit" avec une distribution de "cross-fit" de deux lots de la même accession, montrent que les résidus normalisés se distribuent autour du zéro en cas de "best-fit" pour tous les lots, et la **figure 3.4**, montre une allure en cloche de l'histogramme, très semblable à celle de la loi normale et les résidus normalisés se distribuent autour du zéro. On peut dire que les hypothèses de normalité et la moyenne zéro des résidus ont été respectées dans le cas de "best-fit" pour tous les lots. Au contraire en cas de "cross-fit", on trouve que les hypothèses ont été respectées dans un seul cas (accession 2690). Dans les douze autres cas la moyenne des résidus était trop différente de zéro ou plus grande que zéro.

Basé sur les résultats de ce test on peut dire qu'il n'y a pas de différence entre les lots uniquement dans le cas de l'accession 2690, mais pour le reste des accessions il y a des différences entre les lots de même accession.

Basés sur le test de K-S, que nous avons utilisé pour comparer entre le meilleur ajustement de deux lots différents de la même accession. Nous avons trouvé des différences significatives entre les lots de la même accession dans six cas sur treize (p-value < 0.05), les différences étaient entre les lots des accessions 2700, 2716, 2718, 2920, 2931 et 2936. En

plus, pas de différences significatives trouvées entre les lots de la même accession dans sept cas accessions 2690, 2717, 2721,2762, 2793, 2897 et 3033.

À partir des résultats du test NSE, nous avons trouvé des différences significatives entre les lots de la même accession dans huit cas sur treize car les valeurs de NSE étaient inférieures à zéro. Alors qu'une efficacité inférieure à zéro se produit lorsque la moyenne observée d'un lot est un meilleur prédicteur que le meilleur ajustement d'un autre lot. Les différences étaient entre les lots des accessions 2690, 2700, 2716, 2717, 2718, 2920, 2931 et 2936. Et, pas de différences significatives trouvées entre les lots de la même accession dans cinq cas accessions 2721, 2762, 2739, 2879 et 3033, car NSE > 0.0.

Enfin, basés sur les résultats de différente méthode d'analyses, qui ont été effectuées, nous constatons qu'il existe une forte différence entre les lots de même accession sur la germination de la graine en réponse aux températures. Ces résultats confirment l'effet du lieu de conservation sur la germination des graines en réponse à la température, même si théoriquement elles ont été stockées dans les mêmes conditions et pour des durées de stockage égales.

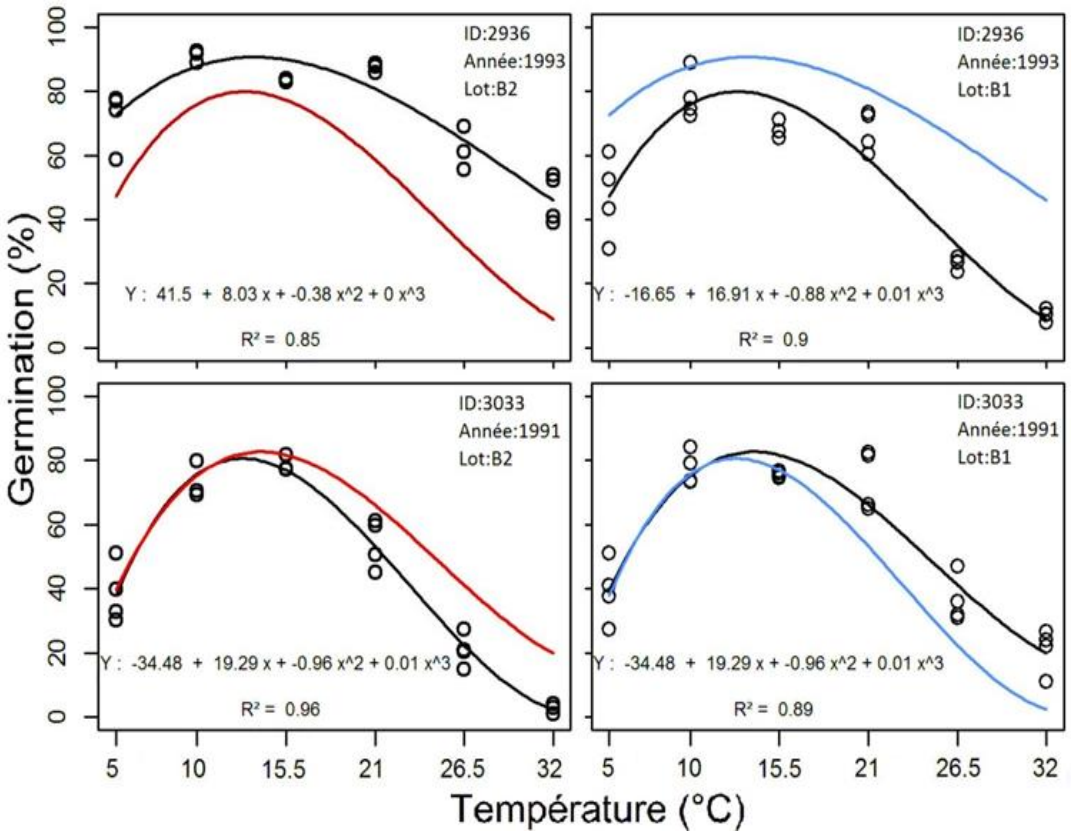


Figure 3. 3: Effet lieu de stockage des lots de graines, pourcentage de germination maximum chez treize accessions de ray-grass anglais, en réponse aux températures, avec deux lots de graines par accession (un lot à gauche, un lot à droite). La courbe rouge représente la germination maximale ajustée de lot à droite et la courbe bleue représente la germination maximale ajustée de lot à gauche. (Suite : deux pages suivantes).

Figure 3.3. Suite

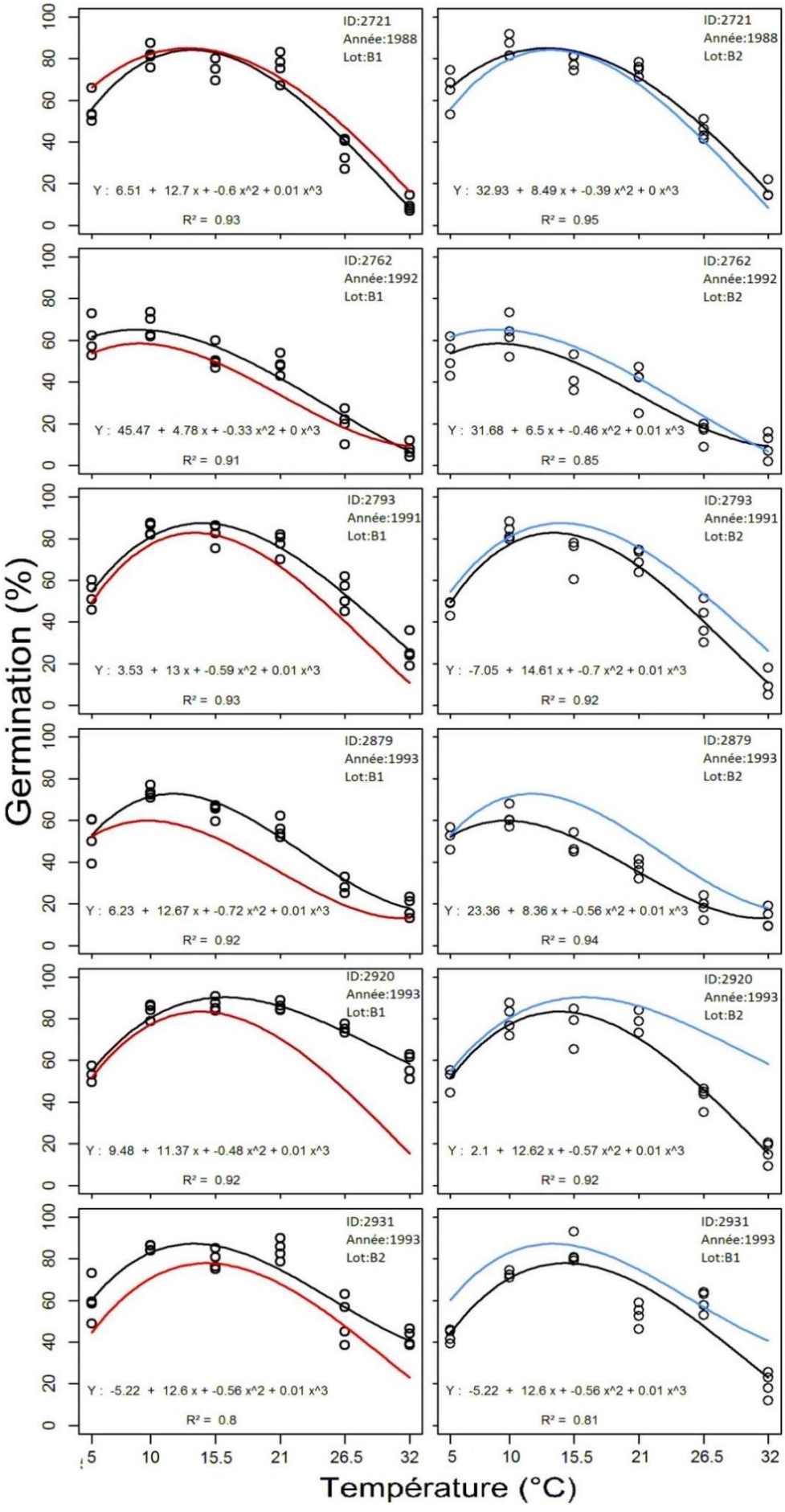
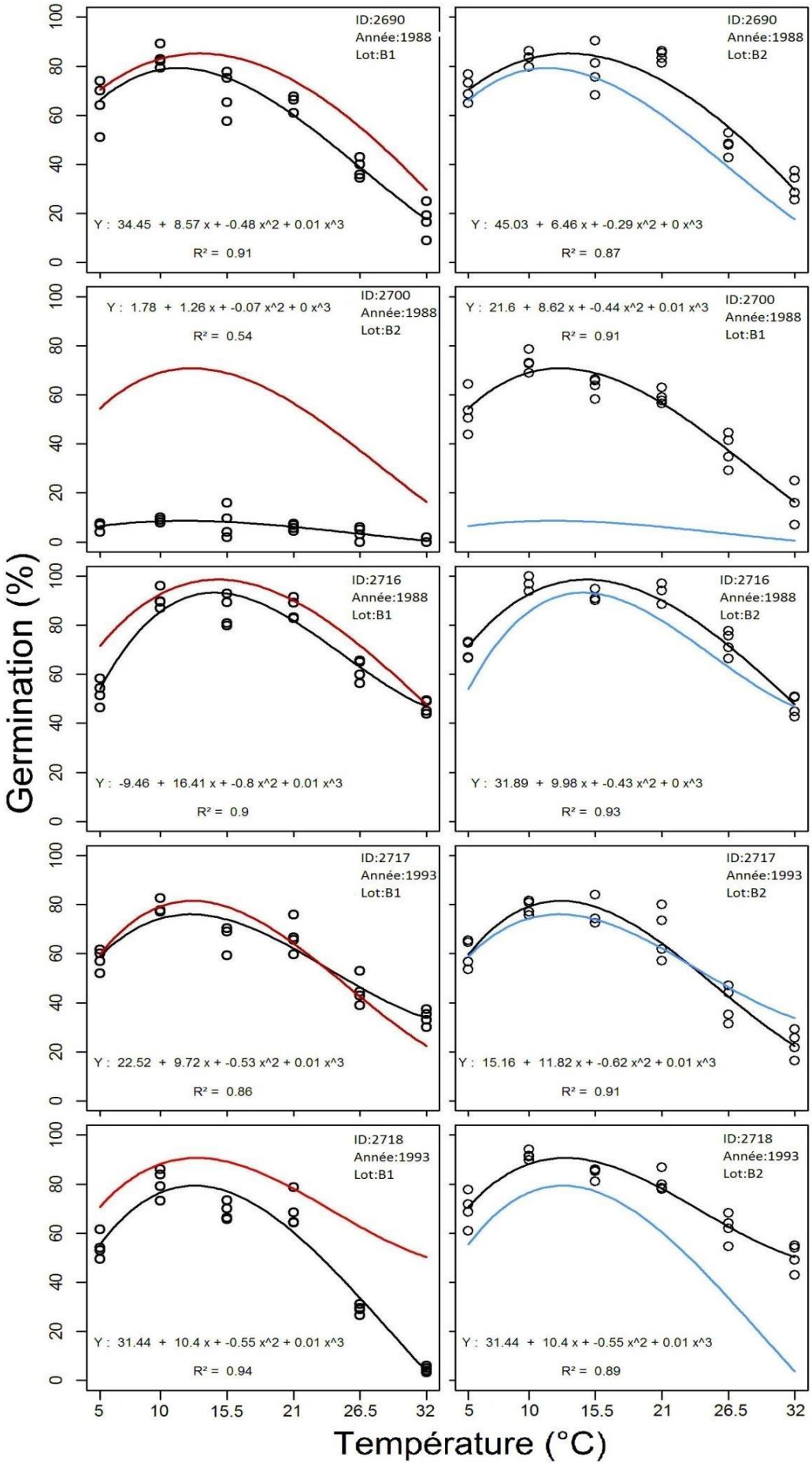


Figure 3.3. Suite



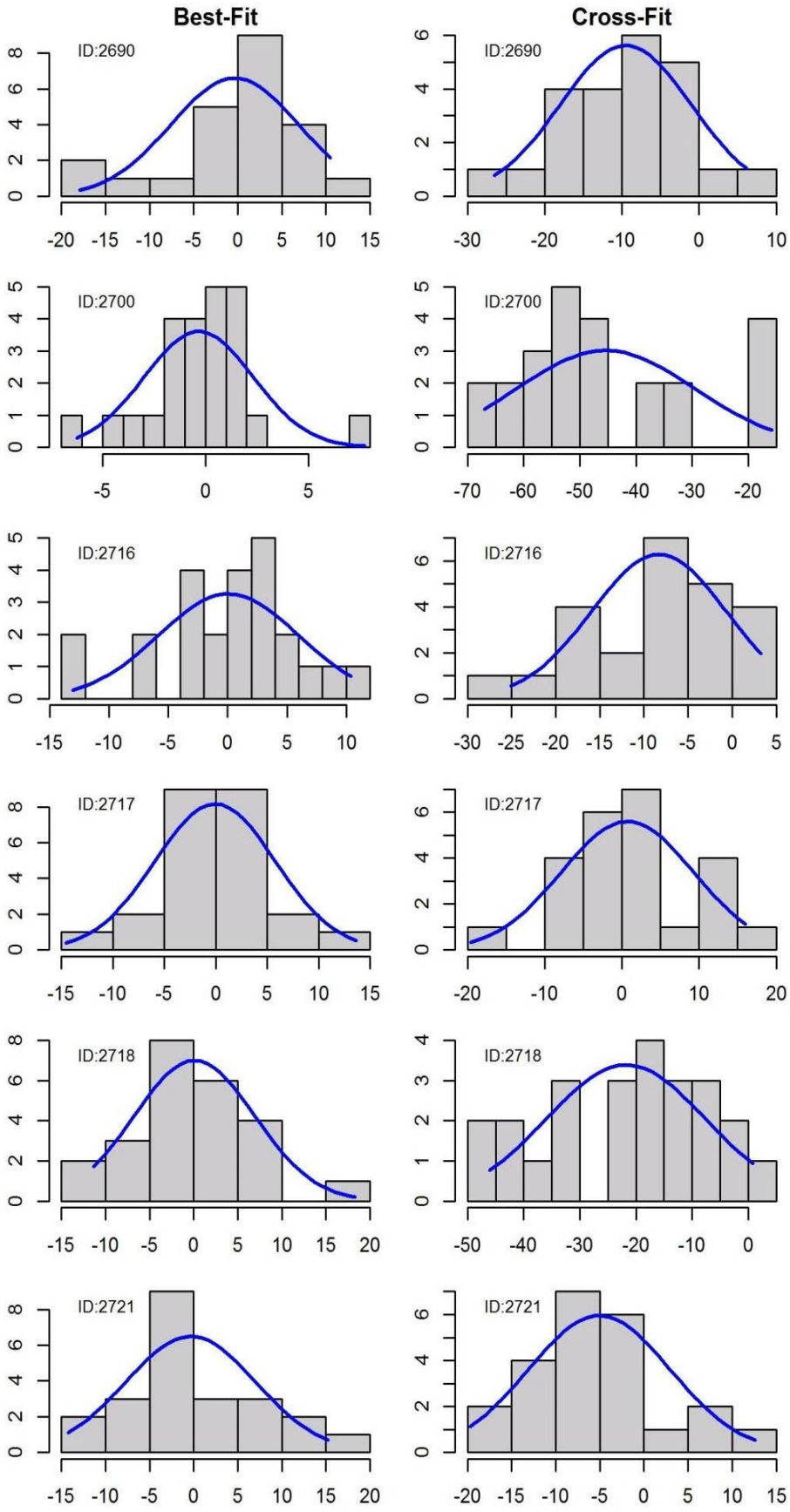
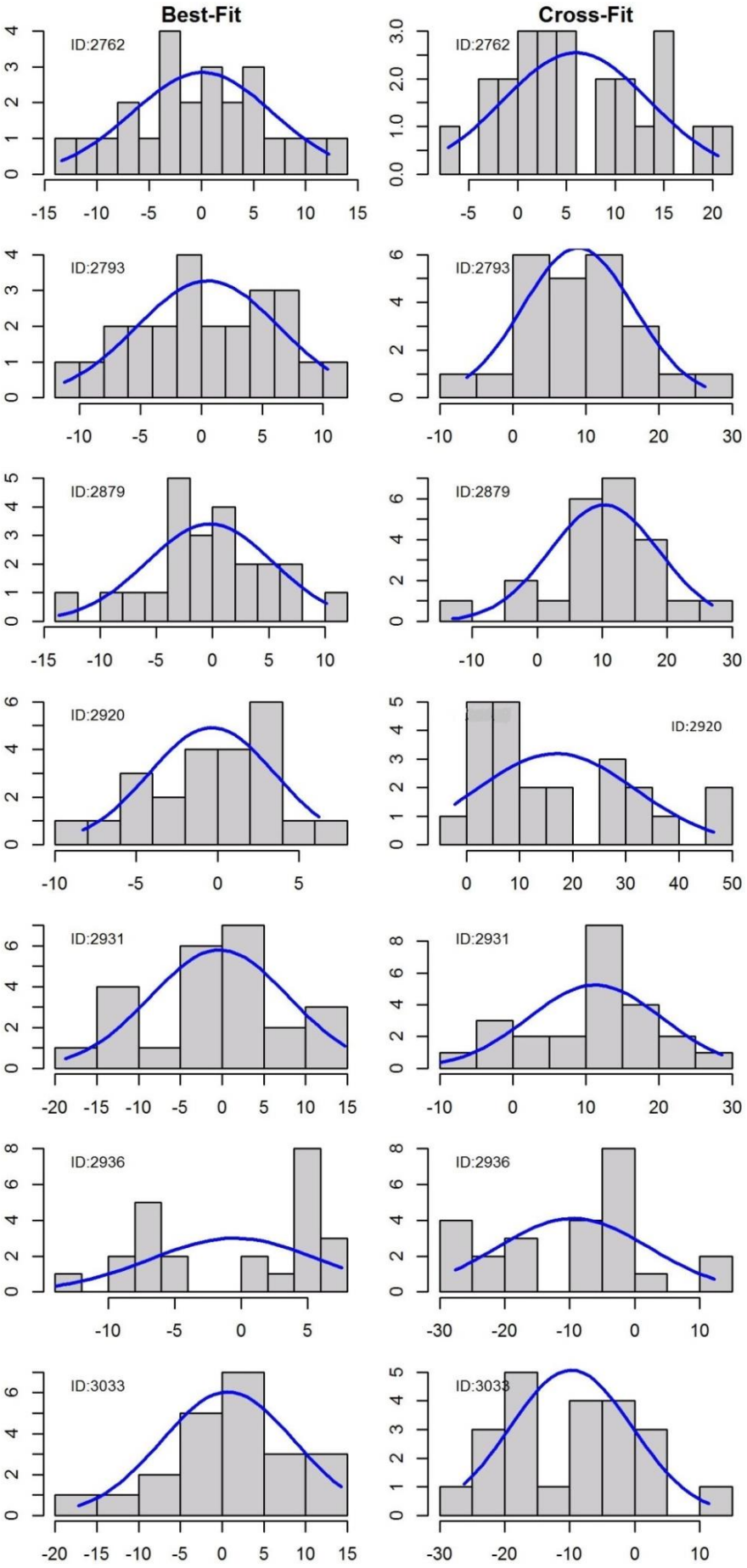


Figure 3. 4 : histogramme de résidus, comparé entre la distribution du best-fit (résidus des données d'un lot et le meilleur ajustement du même lot) et le cross-fit (résidus des données d'un lot et le meilleur ajustement d'un autre lot) de chaque accession, chez treize accessions de ray-grass anglais (Suite : page suivante).

Figure 3.4. Suite



4. DISCUSSION

De nombreux facteurs déterminent la longévité des graines pendant le stockage. Ceux-ci comprennent la viabilité initiale, le stade de maturité à la récolte, la teneur en humidité initiale des graines entrant en stockage, les variations de la teneur en humidité des graines ainsi que la composition de l'atmosphères (gaz), la température et l'humidité relative de stockage (Tatipata, 2009).

Dans cette étude, nous avons comparé la réponse germinative à la température (5; 10; 15,5; 21; 26,5; 32 °C) de lots de graines d'âge différent ou conservés à des endroits différents.

Les résultats de cette étude montrent bien, qu'il existe une forte différence entre les lots de chaque accession en réponse aux températures, quand, ils étaient stockés à différents endroits ou pour différentes périodes.

Quant à l'effet de l'âge des graines, les différences entre les courbes de réponse à la température étaient plus élevées nettement à haute température qu'à basses températures entre certains lots de même accession (**Figure 3.1**). Cette constatation est concordante avec (Onyekwelu and Fayose, 2007) la durée et les méthodes de stockage ont eu un effet significatif sur la viabilité des graines. Il y a eu une diminution significative et progressive de la germination des graines avec une augmentation de la durée de conservation. Cette perte de viabilité de graines pendant le stockage peut être le résultat des dommages à l'ADN (Murata, 1991). La perte de viabilité des graines en fonction du temps suit généralement un schéma sigmoïde, les caractéristiques de la courbe étant variables d'une espèce à l'autre et considérées comme dépendant principalement de la température de stockage et de la teneur en eau des graines (Ellis, 1991; Nagel and Börner, 2010). Une perte de viabilité dans les lots de graines vieillies s'accompagne généralement d'une diminution de la vigueur des graines (Grzegorz Zurek, 1999).

Dans cette étude, la différence du pourcentage de la germination chez les lots d'une accession stockée dans des lieux différents pour la même période et dans les mêmes conditions peut être due à la différence d'équipement et de personnes qui travaillent, qui peut entraîner une différence de teneur en humidité et de fluctuation des températures. Ellis (1985), La température de stockage et la teneur en humidité sont les facteurs les plus importants qui affectent la longévité des graines, la teneur en eau des graines ayant généralement plus d'influence que la température.

Tableau .3. 1: Liste d'accession avec l'année de récolte et la période de stockage de chaque lot.

ID accession	Année de récolte	Lot	Période de stockage (Année)
2693	2012	B1	3
	1988	B1	27
2703	2014	B1	1
	1988	B1	27
2714	2014	B1	1
	1993	B1	22
2743	2013	B1	2
	1989	B1	26
2747	2011	B1	4
	1990	B1	25
2748	2011	B1	4
	1988	B1	27
2749	2014	B1	1
	1990	B1	25
2751	2014	B1	1
	1990	B1	25
2753	2014	B1	1
	1990	B1	25
2754	2011	B1	4
	1990	B1	25
2755	2013	B1	2
	1988	B1	27
2756	2012	B1	3
	1988	B1	27
2839	2011	B1	4
	1990	B1	25
2846	2012	B1	3
	1988	B1	27
2854	2013	B1	2
	1995	B1	20
2857	2014	B1	1
	1993	B1	22
2875	2013	B1	2
	1993	B1	22
2982	2013	B1	2
	1988	B1	27
2984	2012	B1	3
	1988	B1	27
2988	2014	B1	1
	1988	B1	27
2990	2014	B1	1
	1993	B1	22
2992	2012	B1	3
	1988	B1	27

Tableau 3.1. Suite

ID accession	Année de récolte	Lot	Période de stockage (Année)
2996	2012	B1	3
	1988	B1	27
3012	2014	B1	1
	1992	B1	23
3012	2014	B1	1
	1992	B1	23
3027	2012	B1	3
	1988	B1	27
3029	2014	B1	1
	1994	B1	21
3032	2013	B1	2
	1988	B1	27
3038	2014	B1	1
	1991	B1	24
3047	2013	B1	2
	1988	B1	27
3086	2014	B1	1
	1988	B1	27
3135	2012	B1	3
	1993	B1	22
3136	2011	B1	4
	1993	B1	22
3166	2014	B1	1
	1990	B1	25
3198	2012	B1	3
	1988	B1	27

Tableau 3. 2 : Liste d'accession, avec lieu de stockage et année de récolte de chaque lot.

ID accession	**Année de récolte**	**Lot**	Lieu de **stocké**
2690	1988	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2700	1988	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B3	INRA Lusignan
2716	1988	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2717	1993	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2718	1993	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2721	1988	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2762	1992	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2793	1991	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2879	1993	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2920	1993	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2931	1993	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
2936	1993	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud
3033	1991	B1	INRA Clermont-Ferrand
		B2	INRA Le Magneraud

Chapitre IV :

Origine génétique de la capacité germinative à différentes températures ?

1. INTRODUCTION

Le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est la graminée fourragère et à gazon la plus semée sous les climats tempérés du monde. C'est une espèce diploïde (2n = 2x = 14) avec un système d'auto-incompatibilité qui assure un degré élevé de variation génétique dans les populations.

La germination est une étape critique dans le cycle de vie des plantes. L'absorption d'eau par la graine (imbibition) active les processus métaboliques qui entraînent par la suite une expansion de l'embryon et une pénétration de la radicule (ou d'un autre organe) à travers les tissus environnants (Bewley, 2001).

La germination des graines est un processus complexe, en plusieurs étapes, qui nécessite l'expression coordonnée de nombreux gènes dans différents tissus. En raison des diverses fonctions des tissus des graines et des différents processus biochimiques, on s'attend à ce que ces gènes soient régulés de façon coordonnée dans l'espace et dans le temps (Potokina et al., 2002).

La respiration, qui fournit l'énergie métabolique à ces processus, est activée immédiatement après l'imbibition. Des transcrits (ARNm) synthétisés dans les graines au cours de leur développement sont présents dans les graines sèches, mais la plupart sont dégradés peu de temps après l'imbibition. La transcription des gènes liés à la germination et leur traduction en protéines commencent dans les premières heures qui suivent l'hydratation (Bewley et al., 2013). Il est clair que la transition du développement de l'embryon à la germination est soumise à un contrôle génétique strict, qui présente également une forte interaction avec les conditions environnementales (Holdsworth et al., 1999, 2001). Les indices génétiques et environnementaux sont intégrés par la graine pour déterminer le potentiel de germination (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006)

La régulation environnementale de la dormance des graines et de la germination par la température est un processus important qui permet de contrôler les conditions environnementales rencontrées par les plantules de la génération suivante. La capacité des plantes à percevoir à la fois les hautes et les basses températures est la clé de leur survie, mais elle est également utilisée pour réguler un certain nombre de processus de développement (Bewley, 1997). Certaines conditions environnementales doivent être réunies pour lever la dormance des graines puis des conditions supplémentaires doivent être réunies pour permettre la germination (Baskin et Baskin, 1998; Bewley, 1997; Simpson,

1990). Les conditions qui permettent la germination sont des conditions favorables pour le développement de la plantule immédiatement après la germination des graines (Evans and Cabin, 1995; Baskin and Baskin, 1998; Eriksson, 2002; Weinig, 2000; Donohue, 2002).La température pendant la maturation des graines définit l'intensité de la dormance primaire établie lors de la dispersion des graines (Kendall, 2012; Nakabayashi et al., 2012). La température du sol est le principal facteur environnemental dans le cycle saisonnier de dormance de la banque de graines du sol dans les régions tempérées (Footitt et al., 2011, 2013).

Certaines recherches ont démontré que les signaux environnementaux, qui influencent la dormance ou la germination, entraînent la régulation transcriptionnelle du métabolisme des gibbérellines (GA) et de l'acide abscissique (ABA) dans la graine imbibée (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006; Graeber et al., 2012) En particulier, il a été démontré que la lumière et la température influencent les niveaux de GA par la régulation transcriptionnelle de GA bioactif par l'oxydase GA3 et l'inactivation de GA par l'oxydase GA2 (Oh et al., 2006; Yamaguchi et al., 1998; Yamauchi, 2004). De plus, il existe des voies qui fonctionnent indépendamment de la biosynthèse hormonale et qui sont essentielles à l'entrée ou au maintien des états primaires de dormance. Le plus important d'entre eux chez *Arabidopsis thaliana* est l'accumulation de la protéine DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1) (Bentsink et al., 2006).

Divers signaux environnementaux pendant la période de formation des graines provoquent de profondes variations dans la dormance primaire, la température étant le signal le plus important. Sur de nombreuses espèces, l'abaissement de la température pendant la formation des graines provoque une augmentation de leur dormance primaire à maturité (Fenner, 1991; Gu et al., 2006; Schmuths et al., 2006; Donohue et al., 2008; Chiang et al., 2009). De plus, chez *A. thaliana*, il a été montré qu'une température basse augmente le rapport ABA/GA dans les graines via une synthèse accrue d'ABA (Kendall et al., 2011). Un mécanisme clé proposé est l'augmentation à basse température de l'accumulation de la transcription DOG1 pendant la maturation tardive des graines (Chiang et al., 2011; Footitt et al., 2011; Kendall et al., 2011).

Basé sur les résultats de l'effet de la température sur le pourcentage de germination maximal de la thèse d'Ahmed Lina (2015) (**Figure 4.1**), ainsi que des résultats décrits au chapitre II de cette thèse, il a été observé que dans le même lot de graines, il existe une variabilité de capacité à germer à différentes températures.

L'objectif de ce chapitre était de répondre à la question suivante : Est-ce que cette variabilité de la réponse germinative à la température a une origine génétique et si oui quelles sont les régions du génome impliquées.

Dans ce chapitre, nous avons analysé, I) l'effet de sélections divergentes sur la capacité à germer à différentes températures et II) les différences de fréquences alléliques entre sous-populations issues d'un même lot mais germant ou pas à une température donnée (stratégie de « bulk segragant analysis »).

2. Sélection divergente pour la capacité à germer à différentes températures chez le ray-grass anglais:

2.1. Modèle expérimental et système d'étude

Dans cette étude, deux populations de *Lolium perenne* L. : **ACVF60016** et **ACVF50039** ont été analysées. Ces populations ont été choisies car elles montraient des capacités à germer variables selon la température (**Figure 4.1**). Les graines utilisées pour commencer les sélections divergentes ont été obtenues du CRB de Lusignan en 1991 et en 1990, respectivement. De plus, de nouvelles graines ont été obtenues en 2014 pour la population ACVF60016.

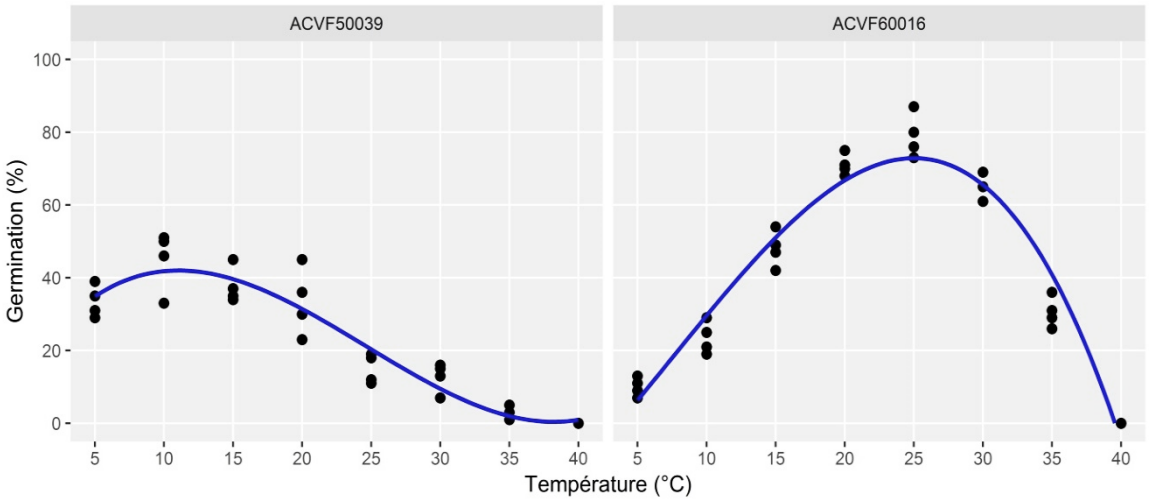


Figure.4.1: Pourcentage de germination maximale de deux populations de *Lolium perenne* L en réponse aux températures.

Le schéma d'une sélection divergente au sein d'une population à Température défavorable (T_0) est présenté dans la **figure 4.2**. Brièvement, il a consisté à :

- Cycle1 :
    - Mettre à germer environ 1000 graines de la population initiale G0 à T_0 et sélectionner des plantules qui ont germé pour être inter-croisées et former la sélection positive (SP) de la génération suivante
    - Mettre à germer les graines qui n'ont pas germé à T_0 à une température optimale de germination T_1 et sélectionner des plantules qui ont germé à T_1 pour être inter-croisées et former la sélection négative (SN) de la génération suivante.
- Cycle 2 et 3 :
    - Mettre à germer environ 1000 graines de SP à T_0 et sélectionner des plantules qui ont germé pour être inter-croisées et former SP de la génération suivante. Les autres graines sont mises à germer à T_1 pour évaluer le pourcentage de germination total.
    - Mettre à germer environ 1000 graines de SN à T_0 puis mettre à germer les graines qui n'ont pas germé à T_0 à une température optimale de germination T_1 et sélectionner des plantules qui ont germé à T_1 pour être inter-croisées et former SN de la génération suivante.

L'ensemble des populations (le lot initial de la population ACVF60016 de 1991 a été remplacé par un nouveau lot obtenu en 2014) ont ensuite été mises à germer à la température T_0 dans un même dispositif pour évaluer leur capacité à germer à cette température. Pour chaque population, 10 boîtes de 100 graines ont été observées.

De plus, toutes les populations (5 boîtes de 100 graines par population) ont été mises à germer à la température T_1 pour évaluer leur potentiel optimal de germination. Ce potentiel a été utilisé pour normaliser les pourcentages de germination obtenus à T_0. Dans tous les cas, avant la mise en germination, les graines ont été stratifiées dans l'obscurité pendant 3 jours à 5 °C et 30 % d'humidité relative (HR).

2.2. Analyses statistiques

Les données de pourcentages de germination normalisés ont été analysées par analyse de variance avec un effet population comme effet fixe puis une comparaison multiple des moyennes a été effectuée par le test SNK (Student-Newman-Keuls) pour vérifier les différences entre populations. Le pourcentage de germination d'une boîte de Pétri contenant 100 graines a été considéré comme donnée élémentaire. Tous les calculs et tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel R (version 3.1.2 ; R Development Core Team, 2014).

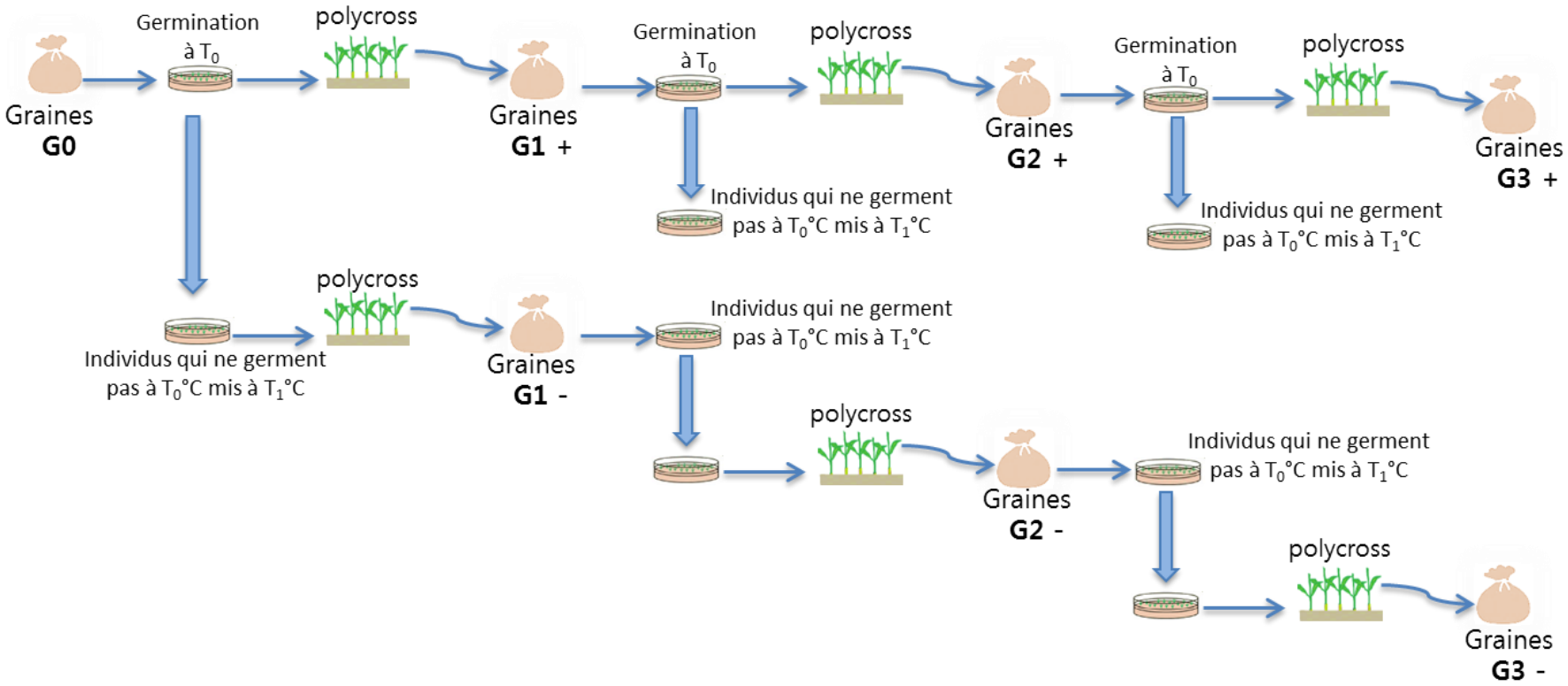


Figure.4.2: Schéma illustrant les étapes des sélections divergentes de différentes générations basse aux leur capacité à germer en différentes températures. (T_0= Température défavorable et T_1= la température optimale)

2.3. RESULTATS

Pour la population ACVF50039, 90 graines sur 1000 (dix répétitions de cent graines) du lot initial (G0, ayant une capacité germinative de 31 % à la température optimale T_1=10 °C) ont germées à T_0=25 °C (25) puis les graines non germées à 25 °C (910 graines) ont été transférées à T_1=10 °C (10-25) jusqu'à l'obtention de suffisamment de graines pour l'inter-croisement. Pour les générations suivantes, les plantules de chaque traitement ont été mises en inter-croisement (90 plantes pour SP et 280 plantes pour SN). Après la récolte, mille graines des lots (G1+ 25) et (G1- 10-25) ont été mises à germer à 25 °C et ont montré des pourcentages de germination pas significativement ($p>0.72$) différents l'un de l'autre d'environ 97%.

Pour la population ACVF60016 deux sélections divergentes ont été réalisées à deux températures cibles : T_0 = 10 °C et T_0 = 35 °C (le premier cycle de sélection a été réalisé avec T_0 = 35 °C mais les cycles suivants ont été réalisés avec T_0 = 32 °C car aucune germination n'avait été obtenue à 35 °C), et la même température optimale T_1=25 °C.

L'effet des sélections divergentes ainsi que le nombre de plantes inter-croisées à chaque génération sont présentés dans les **figures 4.3** et **4.4** pour la sélection à T_0 = 35-32 °C et la sélection à T_0 = 10 °C, respectivement.

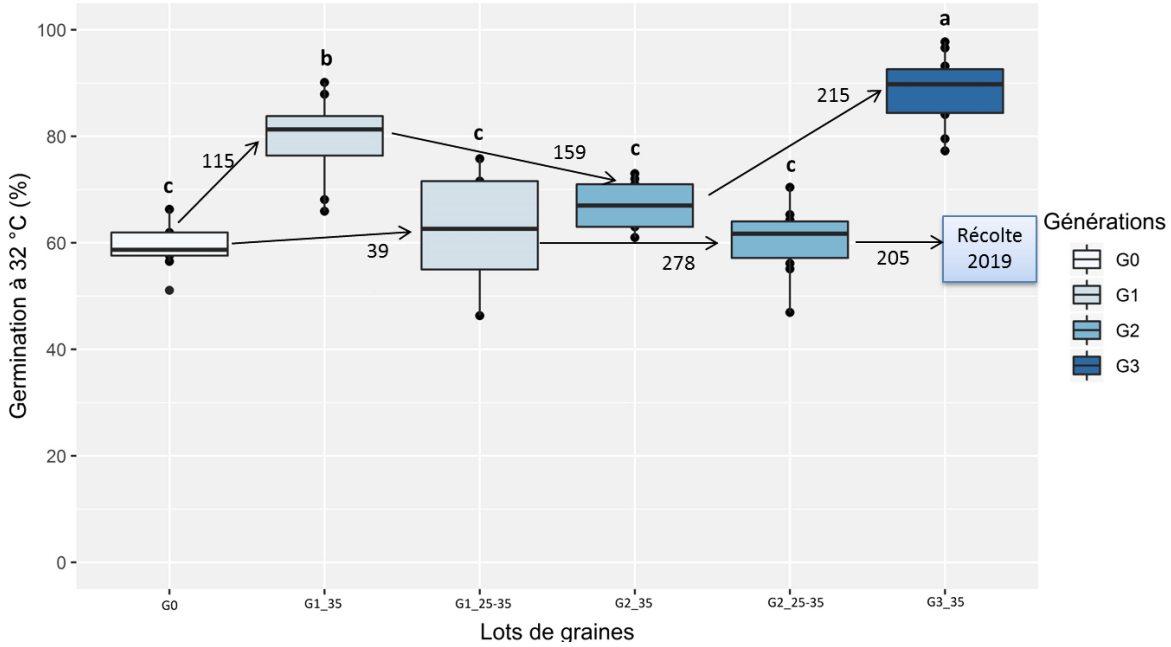


Figure.4.3: Boîtes à moustaches (médiane, 25-75% quantile) décrivant l'effet de la sélection divergente sur le pourcentage de germination à 32 °C, de la population ACVF60016. Les chiffres représentent le nombre d'individus sélectionnés. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les populations avec un test de Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Une augmentation du pourcentage de germination à 32 °C a été observée entre la population initiale et les populations issues de SP et SN. Aucune réponse marquante à la sélection n'est ensuite observée pour les sélections SP et SN. On peut noter cependant une différence significative de germination à 32 °C entre les populations SP et SN issues du premier cycle de sélection. Cette tendance semble se maintenir dans les cycles suivants mais reste à être confirmée avec les résultats du troisième cycle de SN qui n'ont pu être obtenus pour l'instant car les plantes étaient trop petites pour donner des graines en 2018 (**Figure.4.3**).

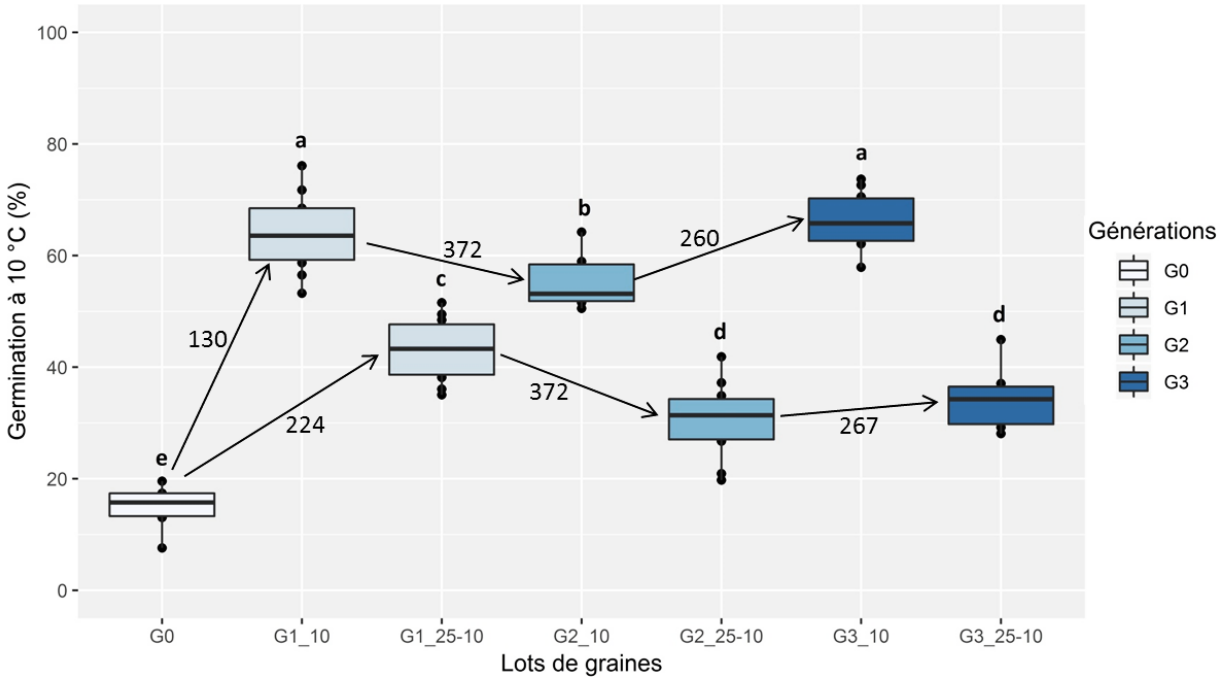


Figure.4.4: Boîtes à moustaches (médiane, 25-75% quantile) décrivant l'effet de la sélection divergente sur le pourcentage de germination à 10 °C, de la population ACVF60016. Les chiffres représentent le nombre d'individus sélectionnés. Différentes lettres indiquent une différence significative entre les populations avec un test de Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Une très forte augmentation du pourcentage de germination à 10 °C a été observée entre la population initiale et les populations issues de SP et SN. Aucune réponse marquante à la sélection n'est ensuite observée pour SP alors qu'une diminution significative du pourcentage de germination à 10 °C est observée pour SN. À chaque cycle, les populations issues des SP et SN sont significativement différentes (**Figure.4.4**).

2.4. DISCUSSION

Les réactions de germination des graines à divers facteurs environnementaux peuvent (ou non) avoir une base génétique (Baskin et Baskin, 2014). Les obtenteurs de variétés ont sélectionné des lignées dormantes et/ou non dormantes pour de nombreuses espèces. Chez *Sinapis arvensis* (Garbutt et Witcombe, 1986), *Lupinus* spp. (Miao et al., 2010) et *Eleusine* spp. (Hilu et De Wet, 1980), des lignées avec des graines non dormantes ont été sélectionnées, alors que chez *Solanum tuberosum* (Simmonds, 1964), *Avena fatua* (Naylor et Jana, 1976) et *Oldenlandia corymbosa* (Do Cao et al., 1978), des lignées dormantes et non dormantes ont été développées.

Pour la population ACVF50039, aucun effet de la sélection n'a été mis en évidence. Le faible pourcentage de germination observé à 25 °C dans la population initiale pourrait être expliqué par le vieillissement des graines qui ont été obtenues en 1990. Ce vieillissement aurait un effet plus marqué sur la capacité à germer à 25 °C que sur la capacité à germer à 10 °C.

Pour la population ACVF60016, le premier cycle de sélection à 35 °C montre une augmentation de la capacité à germer à 32 °C pour la SP et pas d'effet pour la SN. Il y a donc un contrôle génétique de la capacité à germer à 35 °C. L'absence totale de germination à 35 °C des graines issues du premier cycle de sélection nous a contraints de continuer l'expérience en utilisant 32 °C au lieu de 35 °C. Cependant, la chute de la capacité à germer au-dessus de 25 °C est très rapide engendrant une forte différence de capacité à germer à 32 °C et à 35 °C. De ce fait, les capacités à germer observées à 32 °C sont très élevées masquant d'éventuelles différences à d'autres températures. Afin de mieux évaluer l'effet de la sélection, il faudrait mesurer la capacité à germer des différentes populations issues de sélection sur l'ensemble de la gamme de température de 5 à 35 °C.

Pour la population ACVF60016, le premier cycle de sélection à 10 °C montre une très forte augmentation du pourcentage de germination de la population SP. La bonne capacité à germer à 10 °C n'évolue plus dans les deux cycles suivants de sélection positive. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence d'un gène dominant de dormance (D) des graines à faibles températures. Dès le premier cycle de sélection, les individus homozygotes non dormants (dd) à ce gène auraient été sélectionnés pour

donner un fort niveau de germination à 10 °C. Dans les autres cycles de sélection, ce gène étant fixé, il n'y a plus de réponse à la sélection. Ce gène à effet majeur n'explique pas toute la capacité à germer à 10 °C (environ 60% de germination normalisée au pourcentage de germination à la température optimale de 25 °C) et d'autres gènes à effet plus modéré doivent aussi être impliqués. Ce résultat est en adéquation avec l'étude de (Baskin et Baskin, 2014), dans laquelle la germination des graines de *Lycopersicon esculentum* à basse température est contrôlée par un seul gène récessif. Une étude sur les exigences de germination d'*Avena fatua,* d'A. *ludoviciana* et de leurs hybrides a donné lieu à des hypothèses concernant le nombre de gènes impliqués dans l'exigence de température pour lever la dormance. Cependant, l'absence de germination d'A. *Fatua* à 5 °C est probablement contrôlée par trois *loci* récessifs, et l'absence de germination d'A. *ludoviciana* à 18° C peut être contrôlée par un seul gène récessif (Whittington et al., 1970).

De manière non attendue, une forte augmentation du pourcentage de germination à 10 °C a été observée entre la population initiale et la population issue du premier cycle de SN. Cette augmentation pourrait être expliquée par le fait qu'en sélectionnant les premiers individus (244 graines) germant à la température optimale de 25 °C, nous avons sélectionné des individus qui germaient plus rapidement que les autres et ceci pour l'ensemble des températures dont 10 °C. Ceci reste à vérifier sur l'ensemble de la gamme de température de 5 à 35° C. La capacité à germer à 10 °C diminue au cours du prochain cycle de sélection négative comme attendu. Ces résultats peuvent être rapprochés d'une étude chez la luzerne qui montre qu'après deux cycles de sélection pour une germination rapide à 5 °C, le temps de germination a diminué de 29 % (Klos et Brummer, 2000). De plus, la réponse à la sélection a été la plus forte au cours du premier cycle de sélection.

En conclusion, nous avons montré que les différences de pourcentage de germination en fonction de la température pouvaient en partie être d'origine génétique et de ce fait qu'il pouvait être possible de sélectionner pour une capacité à germer ou pas à une température donnée.

3. Bulk Segragant Analysis (BSA)

L'objectif de cette analyse est d'identifier des marqueurs liés à des différences de capacité à germer à différentes températures. Pour cela nous avons comparé les fréquences alléliques de pools d'individus contrastés pour leur capacité à germer à différentes températures. Les fréquences alléliques ont été estimées sur des mélanges de feuilles par pool par marquage GBS (Elshire et al. 2011). A la vue des résultats de l'étude précédente montrant que les différences de capacité germinative dans la population ACVF 50039 étaient certainement liées au vieillissement des graines, seules les données sur la population ACVF 60016 ont été exploitées.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1. Matériel végétal et extraction d'ADN

L'ADN a été extrait à partir de mélanges de feuilles d'individus ayant la même capacité germinative à différentes températures : germination à 25°C, germination à 10°C, germination à 35°C, pas de germination à 10°C et germination à 25°C (25-10), pas de germination à 35°C et germination à 25 (25-35). Pour chaque individu, un fragment de feuille de 1 cm a été utilisé. Le nombre d'individus par mélange était de 39 à 265 (Tableau 4.1). L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée à l'aide d'une méthode CTAB modifiée (Doyle et Doyle, 1990; Pauly et al., 2012)

Tableau 4.1 : Description du prélèvement de cinq pools d'individus.

Pools	Nombre d'individus	Poids total (mg)	Poids de 1cm de feuille (mg)
10	130	62.2	0.50
25 -10	265	144	0.54
35	114	64.1	0.56
25-35	39	18	0.46
25	167	163	0.97

3.1.2. Préparation de banques GBS (Genotyping by Sequencing)

Les cinq solutions d'ADN de chaque mélange ont été traitées séparément pour réaliser des banques selon le protocole GBS d'Elshire et al., 2011 avec des barcodes différents. Pour chaque banque, cinq PCR ont été mélangées de manière proportionnelle. Ces cinq banques ont ensuite été mélangées de manière proportionnelle pour créer une « super banque » qui a été séquencée sur une ligne de séquenceur HiSeq 3000.

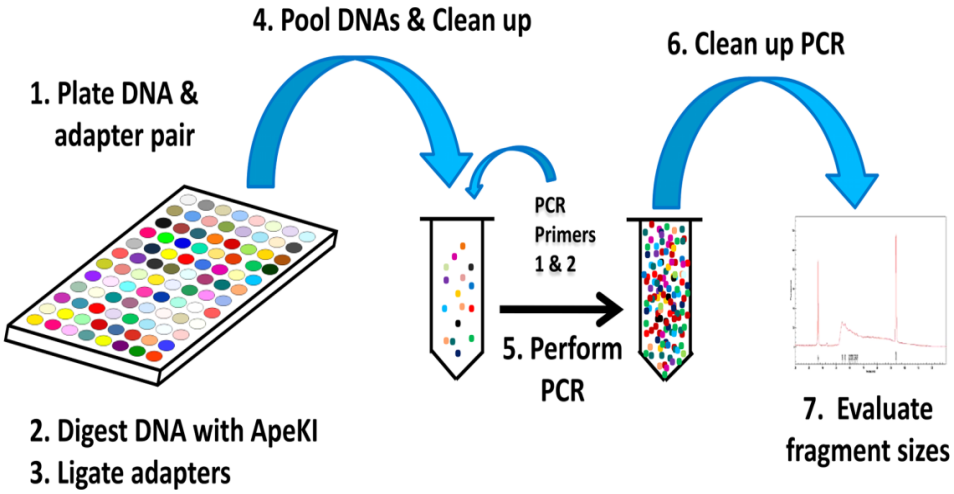


Figure 4.5. Étapes de la construction d'une banque GBS.

Pour chaque mélange, 100 ng d'ADN ont été digérés pendant 2 h à 75 °C avec *Ape*KI dans un volume de 20 µl contenant 16 µl de tampon NEB 3 et 3,6 U d'*Ape*KI. Les adaptateurs (3.6 ng) ont ensuite été liés aux extrémités cohésives en ajoutant 30 µl d'une solution contenant 5 µl de tampon ligase et 640 U de T4 ligase. Les échantillons ont été incubés à 22 °C pendant 1 h et chauffés à 65 °C pendant 30 min pour inactiver la T4 ligase.

Après purification (QIAquick PCR purification, Qiagen), les échantillons ont été amplifiés par PCR (21 cycles à Tm=65°C pendant 30s avec la Taq TermoScientific) avec les amorces suivantes

(A) 5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT et

(B) 5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT.

Les banques ont été considérées comme appropriées pour le séquençage si les dimères d'adaptateurs (128 pb de longueur) étaient minimes ou absents et si la majorité des autres fragments d'ADN étaient entre 25 et 1000 pb. Le séquençage a été réalisé sur la plateforme INRA GeT-PlaGE avec une séquenceur HiSeq 3000 (Illumina) en paired-end.

3.1.3. Analyse bio-informatique

Les séquences brutes (29 à 42 million de séquences par mélange) ont été nettoyées (retrait des séquences d'adaptateurs, qualité > 30 et taille > 60 pb) avec les logiciels Sickle et Scythe puis alignées sur la séquence génomique du ray-grass anglais (Byrne et al., 2015) avec le logiciel bwa. Ces alignements ont servi pour la détection de variants (SNP et IN/DEL) avec le logiciel GATK et la producteur d'un fichier *.vcf. Ce fichier a ensuite était filtré sous R pour ne conserver que les SNP biallélques avec une profondeur de séquençage de 30. Les fréquences alléliques pour chaque SNP ont ensuite été calculées comme le ratio entre le nombre de séquences avec la base alternative et le nombre total de séquences.

3.1.4. Analyse statistique

Pour les 5 mélanges d'ADN, nous avons calculé les fréquences alléliques de 377056 marqueur (SNP biallélique). Par la suite, nous avons utilisé un **test d'homogénéité** (*u*) pour comparer les fréquences entre deux mélanges d'ADN. La statistique du test s'écrit :

$$p = \frac{n_1 f_1 + n_2 f_2}{n_1 + n_2}$$

$$u = \frac{f_1 - f_2}{\sqrt{p(1-p)(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})}}$$

Où f_1 la fréquence de (SNP) et n_1 le nombre de séquences du mélange 1.

f_2 la fréquence de (SNP) et n_2 le nombre de séquences du mélange 2.

u suit une loi normale centrée réduite sous l'hypothèse nulle que $f_1 = f_2$. La fonction **pnorm(x)** sous R a été utilisée pour calculer la probabilité critique *p*-valeur. Le nombre important de tests réalisés a été pris en compte en calculant pour chaque p-valeur une valeur corrigée : *q*-valeur à partir d'une approche optimisant le FDR (False Discovery Rate) (Storey, 2002; Storey et Tibshirani, 2003).

3.2 RESULTATS

Dans cette étude, nous avons effectué 10 comparaisons entre les cinq pools d'ADN (**Figure 4.7**). Le nombre de marqueurs significatifs en fonction de la valeur de q est présenté dans la **figure 4.6**. Un total de 24272 marqueurs (SNP) ont présenté une différence significative $q \leq 0.01$ avec 1930 SNPs à (10 v 25-10), 1638 à (10 v 35), 5386 à (10 v 25-35), 2537 à (10 v 25), 661 à (25-10 v 35), 2654 à (25-10 v 25-35), 1545 à (25-10 v 25), 3142 à (35 v 25-35), 786 à (35 v 25), 4003 à (25-35 v 25).

Une annotation a été recherchée sur NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) pour les 5 marqueurs (SNP) les plus significatifs pour chaque comparaison (Annexe 4.1). Parmi ces marqueurs significatifs, sept se trouvaient à l'intérieur de gènes (Tableau 4.2).

Nous nous intéressés aux marqueurs significatifs dans plusieurs comparaisons. En considérant un seuil de signification ($q \leq 0.0001$), 5295 étaient significatifs dont 7 marqueurs étaient présents dans 6 comparaisons, 2 marqueurs dans 5 comparaisons, 38 marqueurs dans 4 comparaisons et 21 marqueurs dans 3 comparaisons. Parmi ces soixante-huit marqueurs, 15 se situent à l'intérieur de gènes (Tableau 4.3 ; Annexe 4.2).

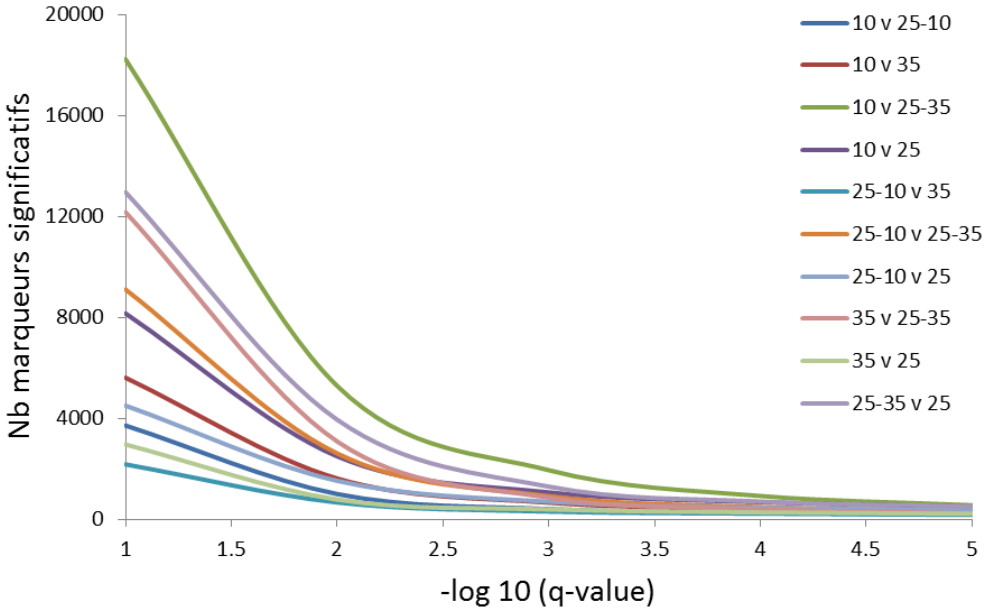


Figure 4.6 : Nombre de marqueurs significatifs à différents niveau de q-value

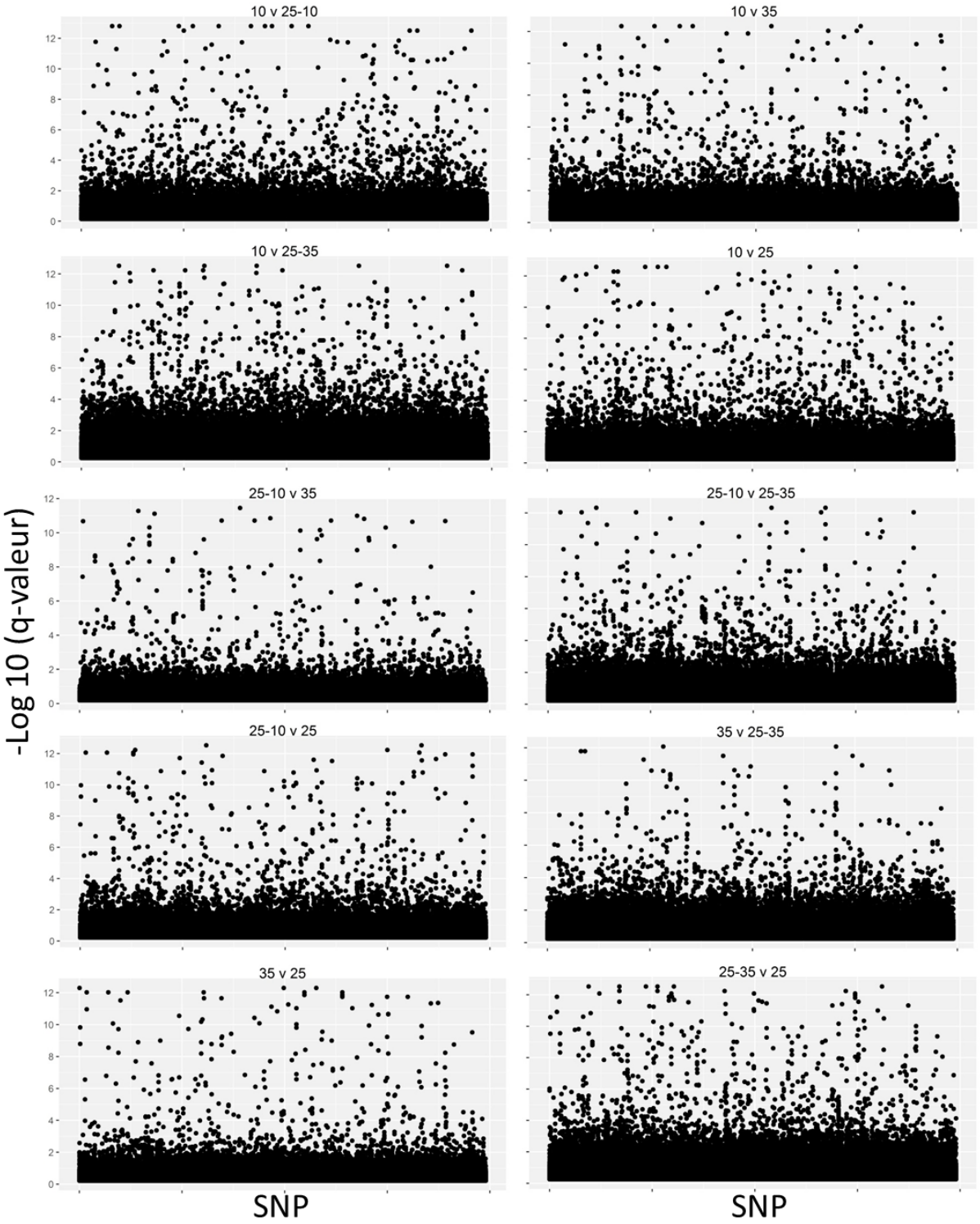


Figure 4.7 : plot de SNP distribution de 10 comparaisons entre 5 pools d'ADN, associé en utilisant 377055 marqueurs de polymorphisme de nucléotide simple (SNP).

3.3 DISCUSSION

La germination et la dormance des graines est un caractère complexe influencé par de nombreux gènes et conditions environnementales (Koornneef et al., 2002). Malgré l'importance du contrôle de la germination et de la dormance des graines dans les cultures céréalières, la connaissance des mécanismes physiologiques et des bases génétiques de ces caractères est très limitée chez les Monocotylédones (Fujino et al., 2008).

Dans ce travail, pour chaque comparaison entre populations germant ou pas à différentes températures, nous avons identifié un grand nombre de marqueurs présentant une différence significative de fréquences alléliques. Certains marqueurs ont été positionnés dans des gènes. Ces gènes peuvent être liés à la capacité d'individus à germer à des températures spécifiques ou à des gammes de températures.

Par exemple, les rétrotransposons *Camilla_7D23_1 et Lotte_7D23_1* ont été identifiés à proximité du locus *VRN1* à partir de deux génotypes de ray-grass anglais (Fjellheim et al., 2014). *VRN1* est le gène central qui contrôle la vernalisation (une période de froid subie par une plante nécessaire pour la faire passer du stade végétatif au stade reproductif) chez les céréales. Ce gène pourrait jouer un rôle dans la capacité des graines à germer à différentes températures.

Graeber et al., (2014), ont trouvé pour *L. sativum* que la surexpression d'*AtDOG1* conduit à un changement de la température optimale de germination vers des températures plus froides (de 24 °C à 18 °C). Le gène *phyA* a joué un rôle important dans la promotion de la germination à des températures plus chaudes. Le gène *phyE* a joué un rôle important dans la germination à des températures plus froides et le gène *phyB* a joué un rôle important dans la germination à travers une gamme de températures (Heschel et al., 2007). D'autres études ont démontré le rôle critique de l'ABA dans la prévention de la germination à haute température et ont identifié un QTL (Htg6.1) et son gène sous-jacent (*LsNCED4*) chez la laitue *(L. serriola*) (Argyris et al., 2005, 2011; Huo et al., 2013).

En conclusion, la comparaison des fréquences alléliques pour de nombreux marqueurs répartis sur le génome entre les individus germant et ceux ne germant pas à différentes températures a permis d'identifier de nombre de gènes potentiellement impliqués dans la capacité des individus à germer à ces températures. L'effet de ces gènes reste à être validé, par exemple par des études d'expression ou par l'étude de populations crées par sélection pour porter des allèles contrastés.

Tableau 4.2 : Cinq marqueurs les plus significatifs dans chaque comparaison.

Comparé	Scaffold	POS	U value	Q value	Accession	Gène	Description
10 v 25-10	scaffold_2574|ref0003849	19389	8.30	0.00	XM_020291409.1	"LOC109732215"	Probable transcription factor At1g61730/protein coding
10 v 35	scaffold_6375|ref0032193	34556	8.37	0.00	JN969603.1	"Lotte_7D23_1 LTR"	Retrotransposon Lotte_7D23_1
25-10 v 35	scaffold_7233|ref0035589	43484	8.39	0.00	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposon:Camilla_74D14_2
25-10 v 25-35	scaffold_2767|ref0015320	29980	8.32	0.00	AP017301.1	"nad4"	NADH dehydrogenase subunit 4 (mitochondrion)
25-10 v 25	scaffold_13074|ref0029220	22289	8.30	0.00	JN969603.1	"Lotte_7D23_1 LTR"	Retrotransposon Lotte_7D23_1
	scaffold_7233|ref0035589	43484	8.34	0.00	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposon:Camilla_74D14_2
35 v 25-35	scaffold_14443|ref0019734	26197	8.46	0.00	KM974751.1	"psbD"	Photosystem II protein D2 (plastid)
25-35 v 25	scaffold_19300|ref0006566	126	8.34	0.00	XM_020328343.1	"LOC109769602"	Cyanophora paradoxa High CO2, cDNA, mRNA sequence
	scaffold_4528|ref0038446	477	8.41	0.00	JX999996.1	"nad6"	NADH dehydrogenase subunit 1, (mitochondrion)

Tableau 4.3 : les marqueurs les plus répète dans différant comparaison.

Scaffold	POS	Répétition	Comparé	Accession	Gène	Description
scaffold_476|ref0026821	75695	6	2, 3, 4, 5, 6,7	XM_010234839.1	"LOC100842615"	Non caractérisé
				XM_010234839.1	"LOC100826217"	Non caractérisé
scaffold_2556|ref0016386	119901	6	2, 3, 4, 5, 6,7	XM_014896246.1	"LOC106865663"	Non caractérisé
				XM_024461599.1	"LOC104582174"	Non caractérisé
scaffold_4102|ref0009159	37196	4	4, 7, 9,10	XM_020299468.1	"LOC109740412"	Non caractérisé
				XM_020344855.1	"LOC109786277"	Non caractérisé
scaffold_4079|ref0004433	50381	4	4, 7, 9,10	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposon Camilla_74D14_1
scaffold_5711|ref0000649	50901	4	4, 7, 9,10	XM_020294870.1	"LOC109735659"	Putrescine ydroxycinnamoyltransferase 1-like
				XM_003578088.4	"LOC100843305"	Putrescine hydroxycinnamoyltransferase 1
				AP014965.1	"Os09g0427550"	Non caractérisé
scaffold_453|ref0014076	118499	4	4, 7, 9,10	XM_020332649.1	"LOC109773922"	Cyclin-F2-2-like
scaffold_778|ref0042896	141324	4	4, 7, 9,10	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposons Camilla_74D14_2
scaffold_45606|ref0005351	751	4	1, 2, 3,4	XM_020295821.1	"LOC109736575"	Non caractérisé
scaffold_17171|ref0044771	2207	4	1, 2, 3,4	AP014964.1	"Os08g0398700"	Non caractérisé
scaffold_2262|ref0002508	35469	3	2, 3, 4	XM_020329154.1	"LOC109770453"	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1-like

Chaque nombre dans la colonne de comparé représente une comparaison entre des pools d'ADN (1= 10 v 25-10, 2= 10 v 35, 3= 10 v 25-35, 4= 10 v 25, 5= 25-10 v 35, 6= 25-10 v 25-35, 7= 25-10 v 25, 8= 35 v 25-35, 9= 35 v 25, 10= 25-35 v 25)

Chapitre V :

It takes long to germinate seeds of cool-season grasses at low temperature

RÉSUMÉ

La température est l'un des facteurs environnementaux les plus influents pour la germination et l'établissement des espèces de graminées. L'objectif spécifique de cette étude était de déterminer les effets d'une température constante basse sur le temps nécessaire pour exprimer la pleine capacité germinative des lots de graines. Quinze accessions de *Lolium perenne L*, *Festuca arundinacea* Schreb, *Dactylis glomerata* L et *Triticum aestivum* L ont été évaluées à des températures constantes de 5 et 21 °C. Comme prévu, les vitesses de germination ont été plus rapides à 21 °C qu'à 5 °C. Par conséquent, il fallait jusqu'à 21 fois plus de temps aux graines à 5 °C pour atteindre leur capacité germinative maximale (germinabilité à 21 °C). La variabilité génotypique observée pour le rapport des pourcentages de germination entre les deux températures était extrêmement plus variable que ce que l'on trouve dans la littérature sur les graminées vivaces de saison fraîche. Dans la plupart des cas, il n'a pas été observé de différences significatives dans la réponse germinative à 5 et 21 °C. Parmi les quatre espèces, douze des quinze accessions étudiées ont exprimé la même germinabilité à 5 et à 21 °C, à condition de disposer de suffisamment de temps. Seules trois accessions ont un pourcentage de germination final plus élevé à 21 °C qu'à 5 °C. Nos résultats suggèrent qu'en général, les graines à basse température germent ainsi que les graines à des températures presque optimales à condition qu'elles aient suffisamment de temps pour exprimer leur capacité germinative. Ces résultats jettent des doutes sur la validité des conclusions retirées dans de nombreuses études où des expériences de germination ont été effectuées pendant une période de temps insuffisante pour obtenir une germination complète à basse température. Une autre trouvaille majeure dans ce travail concerne le risque de mauvaise estimation de la germination à basse température lorsque des protocoles non adaptés sont adoptés.

Mots clés : germination, germabilité, blé, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*, *Dactylis glomerata*, *Triticum aestivum.*

1. ABSTRACT

Temperature is one the most influential environmental factors for germination and establishment of grass species. The specific objective of this study was to determine the effects of low constant temperature on the time needed to express the full germination capacity of seed lots. Fifteen accessions of *Lolium perenne* L, *Festuca arundinacea* Schreb, *Dactylis glomerata* L and *Triticum aestivum* L were evaluated at constant temperatures of 5 °C and 21 °C. As expected, the germination rates were faster at 21 °C than at 5 °C. Consequently, seeds at 5 °C needed up to twenty-one times longer to reach the maximum germination capacity (germinability at 21 °C). The genotypic variability found for the ratio of germination rates between the two temperatures was extremely more variable that what is found in the literature for perennial cool-season grasses. On the other hand, in most cases, no significant differences were observed in the germinability response to 5 °C and 21 °C. Within the four species, twelve of the fifteen studied accessions expressed the same germinability at 5 °C and 21 °C, when given enough time. Only three accessions had final germination percentage higher at 21 °C than at 5 °C. Our results suggest that, in general, seeds at low temperature germinate as well as seeds at near-optimal temperatures provided they have enough time to express they germination capacity. These findings cast doubts on the validity of conclusions withdrawn in many studies where germination experiments were performed for a period of time insufficient to obtain full germination at low temperatures. Another major finding in this work concerns the risk of misestimating germinability at low temperature when non-adapted protocols are adopted.

Key words: germination, germinability, wheat, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*, *Dactylis glomerata, Triticum aestivum*

2. INTRODUCTION

Germination is a critical stage in the life cycle of plants. It starts with the uptake of water by the dry seed (imbibition), continues with biochemical preparative processes and the elongation of the embryonic axis, and usually terminates with protrusion of the radicle out of the seed (Bewley and Black, 1994). The effects of environmental factors on seed germination are important for plant establishment, which is relevant both in ecology and agriculture. Optimal germination is a causal factor leading to successful establishment and growth of plants and crops.

Germination test of a seed determines the germination potential or viability of that seed. When the seed germinates, the time between the beginning of imbibition and radicle protrusion out of the seed reflects the rate at which bio-physical and physiological processes occur in the embryo and the seed as a whole (Baskin and Baskin, 2014; Bewley and Black, 1994). On the other hand, germination test of a lot of seeds aim to determine the germination capacity ('germinability'), the rate of germination and the homogeneity of these seeds (Bewley and Black, 1994).

From an agronomic point of view, the germinability of a particular lot of seeds is important to calculate optimum seeding rates, as well as helping to determine whether a particular lot of seeds has the potential to produce a good crop, or should not be used at all. For that, seed testing standards, such as those of the International Rules for Seed Testing (ISTA, 2015) aim to provide testing methods for seeds intended for trade transactions. Nevertheless, it has been often noted that the concepts and methods used by seed technologists and testers are not fully relevant for the characterisation needs of seed physiologists, plant ecologists and seed bank curators (Bewley and Black, 1994).

There are several reasons why seeds may not germinate under a set of favourable environmental conditions, including adequate levels of water, oxygen, light and temperature. In fact, under adequate water and oxygen availability, temperature is the most important environmental factors regulating both timing and rate of seed germination, through effects on seed deterioration, release of dormancy, and the germination process itself (Baskin and Baskin, 1998; Bewley and Black, 1994; Brändel, 2004; McGinnies, 1960).

Many studies have investigated the effects of temperature on germination, exploring the responses of several-hundred species from different biomes (Baskin and Baskin, 2014). Germination of many higher plants, including grasses, is affected by temperature at two

levels: i) the speed of the process (also called germination rate, expressed as the relative number of seeds that germinated per unit of time), and ii) the total fraction of seeds in a lot that germinates (germinability, expressed as percentage) (Bewley et al., 2013).

Concerning the germination rate, the effects of temperature can be expressed in terms of cardinal temperatures, namely the minimum, the optimum, and the maximum temperatures (Copeland and McDonald, 2001; Sachs, 1860; Yan and Hunt, 1999). The rate of the process is the fastest at optimum temperature, while, minimum and maximum temperature determine the range at which seeds can germinate (i.e. beyond these extremes, no germination can occur) (Bewley and Black, 1994; Bewley et al., 2013). Several mathematical models have been proposed to describe the effects of cardinal temperatures on germination rate (Yan and Hunt, 1999).

Seed germination has been studied under both alternating and constant temperature conditions. Using alternating diurnal temperatures in germination studies has long been employed as a method to mimic field conditions (Baskin and Baskin, 2014). However, this approach does not allow the estimation of cardinal temperatures, nor the germination rate response curves to temperature (Yan and Hunt, 1999). On the other hand, alternating temperatures have been reported as favouring germinability in many species (Baskin and Baskin, 2014) including grasses (Shen et al., 2008; Lu et al., 2008) compared to constant temperatures. However, most of these results could be artefacts given that studies under constant temperature did not follow germination for a period long enough to allow maximum germinability at suboptimal temperatures, where germination rates are slow. This artefact is notably observed in papers testing only the responses of seed lots of forage crops to constant temperatures (see references presented in Table 1).

The objective of this study was to test the working hypothesis that seeds at constant low constant temperature germinate as well as seeds at constant near-optimal temperature, provided they have enough time to germinate. To this end, we compared the germination dynamics and the time required to achieve full seed-lots germinability at 5 °C and 21 °C of thirteen accessions of wild populations from three cool-season grass species and two accessions of wheat.

Table 1. List of articles testing the germination responses of forage crops' seed lots at constant and alternating temperatures over various durations.

Reference	Species	Temperature conditions	Temperature Range (°C)	Germinability (%)	Germination rate	Following-up period (day)
Shen et al., 2008	Perennial ryegrass	Constant and alternating	5 - 40	Yes	No	7-14 days
Lu et al., 2008	Tall fescue	Constant and alternating	5 - 40	Yes	No	7-14 days
Monks et al., 2009	Annual and perennial temperate pasture species	Constant	5 - 35	Yes	Yes	19 days
Moot et al., 2000	White clover, Perennial ryegrass	Constant	5 - 30	Yes	Yes	36 days
Larsen and Bibby, 2005	Perennial ryegrass, Red fescue, Kentucky bluegrass	Constant	8 - 24	Yes	Yes	No germination for 3 days
Sharifiamina et al., 2016	Tall fescue	Constant	5 - 32.5	Yes	Yes	50 days
Nori et al., 2014	Annual clover species	Constant	5 - 30	Yes	Yes	35 days*
Palazzo and Brar, 1997	*Festuca spp*.	Constant	10 - 30	Yes	Yes	28 days
Lonati et al., 2009	Legume and grass species	Constant	5 - 35	Yes	Yes	19 days
Butler et al., 2015	Forage Legumes	Constant	5 - 35	Yes	Yes	14 days
Butler et al., 2017	Cool-Season forage grasses	Constant	5 - 35	Yes	Yes	14 days
Zhang et al., 2013	Ryegrass, Tall fescue	Constant	6 - 43	Yes	Yes	44 days

*****estimated from figures in the reference.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Seed Material

Seeds of thirteen accessions of wild populations of cool-season grasses were evaluated in this study (Table 2): three accessions of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb), seven accessions of ryegrass (*Lolium perenne* L.), and three accession of cocksfoot *Dactylis glomerata* L.). Two accessions of wheat (*Triticum aestivum* L.) were also included, for comparative purposes**.** Seeds of grass species were obtained from the URP3F's turf and forage species genebank (Centre INRA nouvelle-Aquitaine-Poitiers, Lusignan, France). Seeds of wheat were obtained from the Plant Breeding Institute, The University of Sydney, Australia. Before the experiments, seeds were stored in dark conditions at 5 °C and 30 % relative humidity.

3.2. Germination Experiment

Seeds of the fifteen accessions were evaluated at constant temperature of 5 or 21 °C. For each accession, four replicates of 100 seeds of grass or 25 seeds of wheat were arranged in a random complete block design. Seeds were put in 90 mm diameter Petri dishes containing a sheet of autoclave-sterilized Whatman paper humidified with 5 ml of deionised and autoclave-sterilized water. For each of the four blocks, Petri dishes were placed in a vented plastic box. Temperature and humidity were continuously monitored by inserting in each box two self-contained temperature, humidity and dew point data loggers (EL-USB-2+, Lascar Electronics Ltd., Salisbury, U.K.). One data logger recorded values every hour and the other one every minute. Seeds were cold stratified in the dark for 7 days at 5 °C and 30 % relative humidity (0.61 kPa of Vapour-pressure deficit, VPD) in order to release any residual seed dormancy. After cold stratification, seeds were germinated in the dark at constant temperatures of 5 or 21 °C in 1.5 m^3 useful-volume growth chambers (Froids et mesures, France). Temperature measurements from five to six thermocouples placed at different positions within each growth chamber, were logged every 20 s. Each growth chamber was regulated so that its temperature (average measurement from the thermocouples) did not exceed ± 0.2 °C of the target temperature.

The frequency of sampling for germination depended on temperature and the number of non-germinated seed within each Petri dish. Seeds were considered as germinated when either the radicle or the coleoptile had protruded out of the seed and was

at least 2 mm long. At each counting, germinated seeds were counted and removed from the Petri dishes. Deionised and autoclave-sterilized water at 5 or 21 °C was added as required to ensure moisture was non-limiting for germination. The maximum period of observation was over 7300 hours (10 months) for 5 °C and over 2300 hours (3 months) for 21 °C. In the case of the accession for which germinability (the final germination percentage) was higher at 21 °C than at 5 °C, seeds that did not germinated at 5 °C were transferred to germinate at 25 °C, to verify that they were still able to germinate.

3.3. Analysis of Germination data

For each temperature treatment and replicate, the cumulative percentage of germination values over time was adjusted using a non-rectangular hyperbola (Ahmed, 2015) of the form:

$$y = \left(\frac{1}{2\theta}\right) \cdot \left(\alpha \cdot (t - tc) + y_{\max} - \sqrt{(\alpha.(t - tc) + y_{\max})^2 - (4.\theta.\alpha(t - tc).y_{\max})}\right) \quad \text{Equation 1}$$

where y is the cumulated germination (expressed in number of seeds); θ is a convexity parameter (unitless); α is the maximum germination rate (seed *per* hour or number of individuals *per* hour); t is time (hour); tc is the lag to start germination (hour) also call delay of germination; and y_{max} is the maximum germination. An advantage of such a model is the possibility of attributing ecophysiological meaning to the parameters.

For each replicate, the time needed to reach a proportion k of the maximum germinated seeds, t_k, was calculated as:

$$t_k = tc + \left[\frac{k.y_{max} - k^2.y_{max}.\theta}{\alpha.(1-k)}\right] \quad \text{Equation 2}$$

Within each accession, the results at 5 °C and 21 °C were compared using the Student's t-test for all response variables. When appropriate, analyses of variance to compare species responses were performed with the general linear model: $Y_{ij} = \mu + S_i + ee_{ij}$, where Y_{ij} is the response of accession *j* of species *i*, μ is the overall mean, Si is the species *i* effect and ee_{ij} is the experimental error associated to values accession *j* of species *i*. Non-parametric Kruskal-Wallis test was used for interspecies comparisons. All calculations and statistical tests were performed using R software (version 3.1.2; R Development Core Team, 2014).

1.1. Typologies of germination responses to temperature

Accessions were grouped based on their responses to temperature in terms of both germinability and rate-related parameters of germination (Table 2). Accessions were first differentiated between those germinating at more ('high') or less ('low' germinability) than 90% at most. Second, these two groups were further divided on the basis of their germination rate, depending whether 95% of germination capacity was reached in less than 240 h (10 days) at 21 °C. Third, differences in the germinability at 5 and 21 °C were studied within each of the four groups. Overall this procedure generates a grid with eight (2 x 2 x 2) types of responses (Table 4).

Table 2. Germinability (final germination percentage), germination start time, maximum germination rate and times to 50% and 95% of germination maxima for fifteen grass accessions. Within each accession and column, values with the same letter are not significantly different based on Student's t-test (P > 0.01).

Species	Accession	Treatment	Germinability (%)	Germination Start time (h) (*tc*)	Maximum germination rate (seed.h^{-1}) (α)	Time to 50% of final germination (h)	Time to 95% of final germination (h)	Time last seed germinated (h)	Time of last count (h)
Festuca arundinacea Schreb.	F020	5 °C	97 a	509 a	0.05 a	1471 a	2344 a	6545	7365
		21 °C	97 a	40 b	1.99 b	68 b	110 b	287	932
	F046	5 °C	56 a	498 a	0.06 a	1147 a	3281 a	5849	7365
		21 °C	64 a	44 b	0.44 b	138 b	483 b	930	1462
	F103	5 °C	97 a	587 a	0.06 a	1393 a	2276 a	5517	7365
		21 °C	94 a	40 b	0.69 b	120 b	295 b	1097	1462
Lolium perenne L.	L030	5 °C	94 a	NA	0.18 a	137 a	489 a	1001	4554
		21 °C	96 a	NA	1.49 b	35 b	73 b	190	932
	L178	5 °C	85 a	58 a	0.22 a	299 a	932 a	3687	5517
		21 °C	91 a	23 a	1.88 b	53 b	117 b	328	932
	L187	5 °C	64 b	265 a	0.22 a	514 a	1166 a	5346	7365
		21 °C	97 a	35 b	1.88 b	62 b	96 b	244	910
	L237	5 °C	81 b	42 a	0.16 a	329 a	794 a	837	5850
		21 °C	92 a	25 a	1.83 b	56 b	106 b	270	1179
	L268	5 °C	92 a	NA	NA	135 a	524 a	793	4035
		21 °C	98 a	NA	NA	43 b	80 b	252	917
	L408	5 °C	71 b	74 a	0.17 a	350 a	1261 a	1844	4559
		21 °C	90 a	44 a	0.66 b	126 b	333 b	1920	2352
	L409	5 °C	77 a	48 a	0.28 a	225 a	823 a	1704	2184
		21 °C	84 a	44 a	1.09 b	97 b	273 b	664	1436
Dactylis glomerata L.	D288	5 °C	93 a	89 a	0.15 a	549 a	1461 a	357	4559
		21 °C	90 a	36 a	0.71 b	114 b	263 b	524	1170
	D290	5 °C	99 a	479 a	0.05 a	1445 a	2319 a	357	4559
		21 °C	96 a	37 b	1.07 b	85 b	156 b	888	932
	D293	5 °C	36 a	364 a	0.06 a	717 a	1625 a	448	4559
		21° C	40 a	30 b	0.51 b	79 b	222 b	608	1462
Triticum aestivum L.	T312	5 °C	99 a	NA	NA	211 a	282 a	409	2184
		21 °C	97 a	NA	NA	32 b	62 b	236	952
	T313	5 °C	98 a	NA	NA	209 a	254 a	409	2184
		21 °C	95 a	NA	NA	24 b	63 b	236	952

4. RESULTS

4.1. Effects of temperature on germination time and germination rate

Several parameters that relate germination to time (Eq. 1 and Eq. 2) were studied, namely: the time when germination starts (*tc*), the time to 50% of final germination (t_{50}), the maximum germination rate (α), the time to 95% of final germination ($t_{95\%}$) and the time of last seed germination (Table 2). Significant differences ($P< 0.01$) between seeds germinating at 5 and 21 °C were observed for α and key timings (*tc,* $t_{50\%}$ and $t_{95\%}$) in general. However, only one on seven accessions of *L. perenne* showed a significant difference in *tc* between 5 and 21 °C. As expected, *tc,* $t_{50\%}$ and $t_{95\%}$ were longer at 5 °C while α was slower.

The ratio of α at 21 °C divided by α at 5 °C ($\alpha_{21\,°C}$ / $\alpha_{5\,°C}$) is an indicator of how many time faster is germination at 21 °C. High variability for this ratio was observed between accessions in general and within species (Table 3), such that a parametric analysis of variance was not applicable because heterocedasticity of the residuals. A Kruskal-Wallis test showed that not significant differences between species exist for $\alpha_{21\,°C}$ / $\alpha_{5\,°C}$ (P = 0.42). On the other hand, the ratios ($tc_{5\,°C}$ / $tc_{21\,°C}$) and ($t_{50\%_5\,°C}$ / $t_{50\%_21\,°C}$) exhibited significant differences between species. In particular, *L. perenne* had lower ratios that *F. arundinacea* (Table 3). As the ratio $(t_{50\%} - tc)_{5\,°C}$ / $(t_{50\%} - tc)_{21\,°C}$) was not significantly different among species, the difference observed for tc50 ($t_{50\%_5\,°C}$ / $t_{50\%_21\,°C}$) seems to be due to the start germination (*tc*) rather to the dynamics of germination of the seed lots.

Table 3. Ratios of maximum germination rates (α) and key germination times (germination start time, time to 50% and 95% of final germination, total and corrected by start time) at 5°and 21°C for seeds lots of grass species and wheat. Within each column, the means of species with the same letter are not significantly different after a Kruskal-Wallis test ($P > 0.01$).

Species	Accession	Ratio of $\alpha_{21°C}/\alpha_{5°C}$		Ratio of $tc_{5°C}/tc_{21°C}$		Ratio of $(t_{50\%})_{5°C}/(t_{50\%})_{21°C}$		Ratio of $(t_{95\%})_{5°C}/(t_{95\%})_{21°C}$		Ratio of $\frac{(t_{50}-tc)5°C}{(t_{50}-tc)21°C}$	
***Festuca arundinacea* Schreb**	F020	39.8		12.73		21.63		21.31		27.68	
	F046	7.3	a	11.32	a	8.31	a	6.79	a	6.90	a
	F103	11.5		14.7		11.61		7.72		10.08	
***Lolium perenne* L.**	L030	8.3		NA		3.29		6.70		NA	
	L178	8.6		2.52		5.64		7.97		8.03	
	L187	8.6		7.57		8.29		12.15		9.22	
	L237	11.4		1.68		5.88		7.49		9.26	
	L268	NA	a	NA	b	3.14	b	6.55	a	NA	a
	L408	3.9		1.68		2.78		3.79		3.37	
	L409	3.9		1.1		2.32		3.01		4.32	
***Dactylis glomerata* L.**	D288	4.7		2.47		4.82		5.56		5.90	
	D290	21.4	a	12.95	ab	12.0	ab	14.87	a	20.13	a
	D293	8.5		12.13		9.08		7.32		7.20	
***Triticum aestivum* L.**	T312	NA		NA		6.59	ab	4.55	a	NA	
	T313	NA		NA		8.71		4.03		NA	

4.2. Effects of temperature on final germination percentage

At near optimal temperature of 21 °C, significant ($P \leq 0.05$) differences in maximum germination (germinability) were found among accessions (Table 2) but not among species. Similar results were observed for maximum germination at 5 °C. These differences can be due to intrinsic properties of the accessions or possibly to the physiological status of the seed lots.

As one of the aims of this work was to test whether germinability is stable between 5 and 21 °C for each accession, pair-wise comparisons (Student's *t*-test) of the maximum germination at 5 and 21 °C were performed for each of the fifteen accessions. For 12 of the 15 accessions no significant differences ($P > 0.01$) in germinability were found between 5 and 21 °C. The three accessions that exhibited significant differences belong to *L perenne*.

4.3. Typologies of germination responses to temperature

A typology of germination dynamics was created based on germinability, germination rate and germinability response to temperature (Table 4). The 15 studied accessions belong to six of the eight possible type described below.

Table 4. Classification of the accessions depending on their germinability (high, germination percentage ≥ 90%; or low, germinability < 90 %), their germination rates (fast, 95% of germination in less than 240 hours at 21 °C; or slow otherwise), and their germinability response to temperature (germinability similar or significantly different between 5 and 21 °C).

Germinability (High or Low)	Germination rate (Fast or Slow)	Temperature-stable Germinability	Germinability varying between 5 and 21 °C
High	Fast	**Type 1**	**Type 5**
		F020	L187
		L030	L237
		L178	
		L268	
		D290	
		T312	
		T313	
	Slow	**Type 2**	**Type 6**
		F103	L408
		D288	
Low	Fast	**Type 3**	**Type 7**
		D293	
	Slow	**Type 4**	**Type 8**
		F046	
		L409	

Type 1 of germination dynamics – high germinability, fast germination and germinability stable across temperatures

The type of germination dynamics the most represented in this study included five accessions belonging to the three forages and the two accessions of wheat (**Figure 1**). These accessions had a high final germination percentage (> 90%) that did not differ significantly (*P > 0.01*) between 5 and 21 °C. Furthermore, this group of accessions had fast germination rates at 21 °C, with at least 95% of germinable seed germinating in less than 240 h (10 days). Indeed, we graded fast rates based only on t_{95}, knowing that α, and t_{50} and t_{95} are related (see Eq 2). Nevertheless, the values of parameter *tc* affects the strength of these relationships.

As expected, germination rates were slower at 5 °C than at 21 °C, despite accessions reached similar final germination percentage at these two temperatures. Furthermore, seeds needed much longer to start germination (*tc*) at 5 °C. For example, at 5 °C accession F020 had a *tc* of around 509 hours and needed about 1284 hours to reach 50% of final number of germinated seeds. On the other hand, at 21 °C this accession needed only 40 hours to start germination and 68 hours to express 50 % of its germinability (Table 2**, Figure 1**).

In order to compare the effect of temperature on germination between wild grass species and domesticated species, seeds of two wheat accessions were included in this study: *Triticum aestivum* T312 and T313. These two accessions had a high germinability at both temperature (no significant differences, *P > 0.01*) and germinated much faster than all the accessions of grass species.

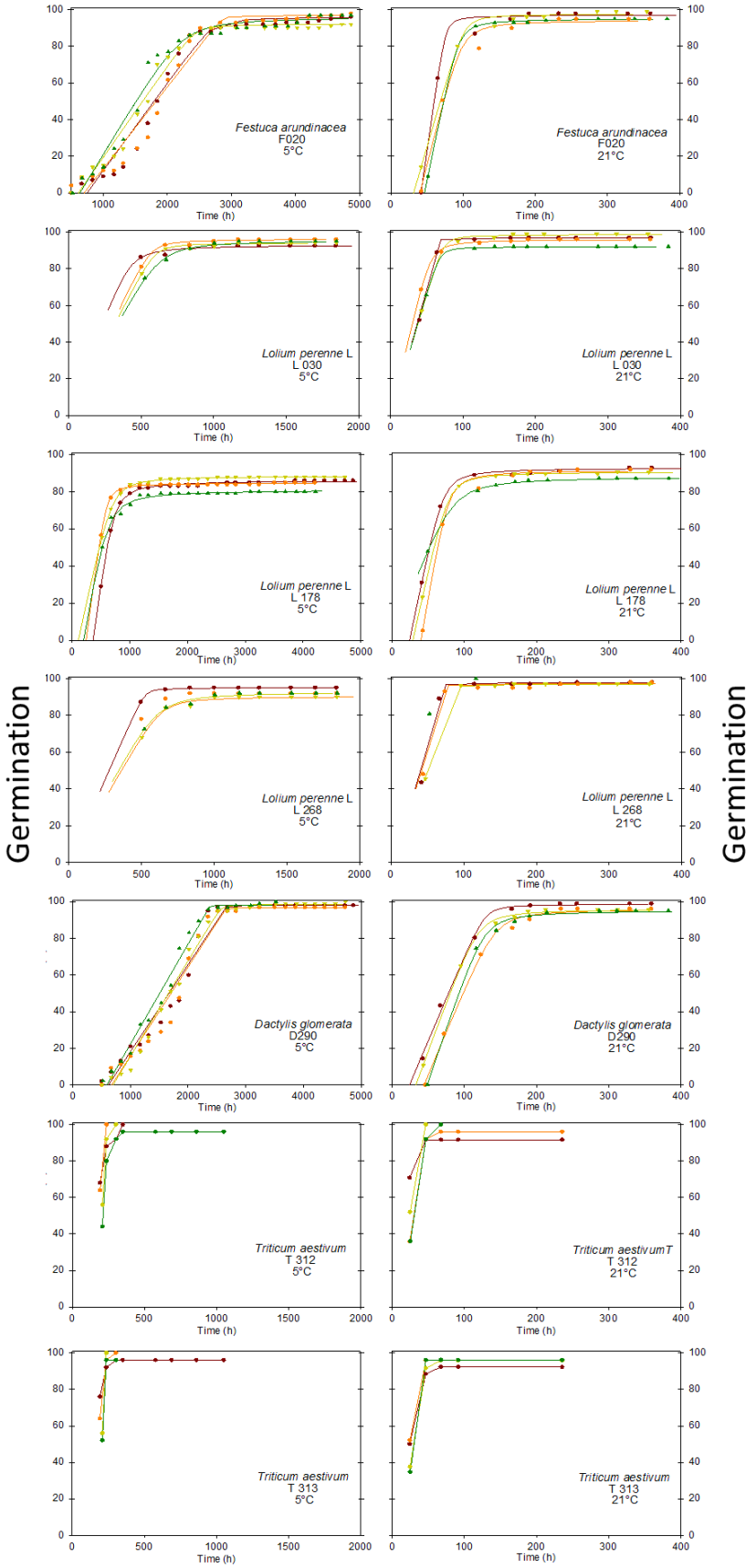


Figure 1. Time course of cumulative germination (%) at 5 °C (left) and 21 °C (right) for Type-1 accessions (i.e. accessions with high germinability that was similar at 5 and 21 °C and had a fast germination rate at 21 °C). The results are presented for the five accessions of cool-season grasses (F020, D290, L178, L030, and L268) and two accessions of wheat (T312 and T313) that belonged to this group. The x-axe scales differ among graphs.

Type 2 of germination dynamics – high germinability, fast germination and germinability stable across temperatures

D. glomerata (D288) and one of *F. arundinacea* (F103) both had high germinability that did not significantly differ (*P≥0.01*) between 5 and 21 °C within each accession (**Table 2, Figure 2**). These accessions had slower germination rates at 21 °C than accessions of Type 1. They needed more than 240 h to reach 95% of their germinabilitly. In addition, as expected, germination rates were much slower at 5 °C than at 21 °C, despite accessions reached similar final germination percentage at these two temperatures (Table 2).

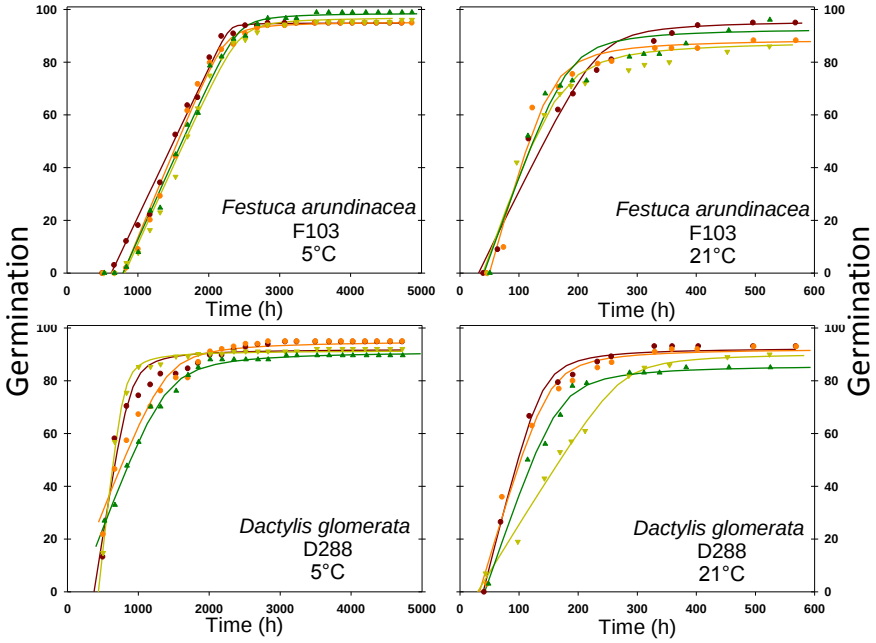


Figure 2. Time course of cumulative germination (%) at 5 °C (left) and 21 °C (right) for Type-2 accessions (i.e. accessions with high germinability that was similar at 5 and 21 °C and had a slow germination rate at 21 °C). The results are presented for the two wild-grass accessions (D288 and F103) that belonged to this group. The x-axe scales differ among graphs.

Type 3 of germination dynamics – low germinability, fast germination and germinability stable across temperatures

Accession D293 of *D. glomerata* had low germinability at both temperatures, with a maximum germination percentage of *ca.* 40%. The reasons for this low level of germination are unknown. However, there was no significant difference (*P > 0.01*) in the response of germinability to 5 and 21 °C (**Table 2, Figure 3**). Despite a low level of germinability, this accession needed only 30 hours to start germination at 21 °C and showed a fast germination rate with less than 240 h needed to reach 95 % of final germination at 21 °C (Table 2).

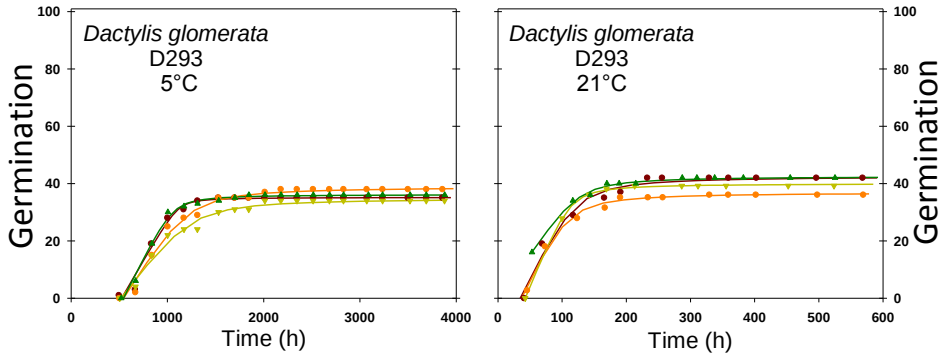


Figure 3. Time course of cumulative (%) at 5 °C (left) and 21 °C (right) for Type-3 accessions (i.e. accessions with low germinability that was similar at 5 and 21 °C and had a fast germination rate at 21 °C). The results are presented for the only wild-grass accession (D293) that belonged to this group. The x-axe scales differ among graphs.

Type 4 of germination dynamics – low germinability, fast germination and germinability stable across temperatures

In the sample of assessed accessions, two had low germinability at both 5 and 21 °C treatments and slow germinations rates 21 °C. This Type 4 of germination dynamics included one accession of *F. arundinacea* (F046) and one of *L. perenne* (L409). Both accessions had relatively low final germination percentages (*ca.* 60 and *ca.* 80 %, respectively) that were not significantly different ($P \geq 0.01$) between 5 and 21 °C for neither of the accessions (**Table 2, Figure 4**). These accessions had slower germination rates at 21 °C than accessions of Type 1 and 3, and needed more than 240 h to reach 95 % of final germination percentage at 21 °C. However, accession L409 had a high value of α (1.09 seed per h, Table 2) but it started germination late (*tc* > 56 h at 21 °C).

Type 5 of germination dynamics – high germinability, fast germination and germinability varying across temperatures

Differences in germinabilitly between 5 and 21 °C was observed for two accessions of L. perenne (L187 and L237) that had high final germination percentage (ca. 100 and ca. 90 % respectively) at 21 °C (**Figure 5**). Further, these accessions had a fast germination rate with less than 240 h needed to reach 95 % of their final germination at 21 °C. As in the other types, germination rates were slower at 5 °C than at 21 °C (Table 2). Finally, accession L237 started germination early in both treatments (estimated tc of 42 h at 5 °C and 25 h at 21 °C). After the last count (more than 5800 h, i.e. 242 days; Table 2), seeds that did not germinate

at 5 °C were transferred to germinate at 25 °C. Another 26 % (L187) and 6 % (L237) seeds germinated after 500 hours at 25 °C, which brought the overall germinability of these accessions to 90 % for L187 and 87 % for L237.

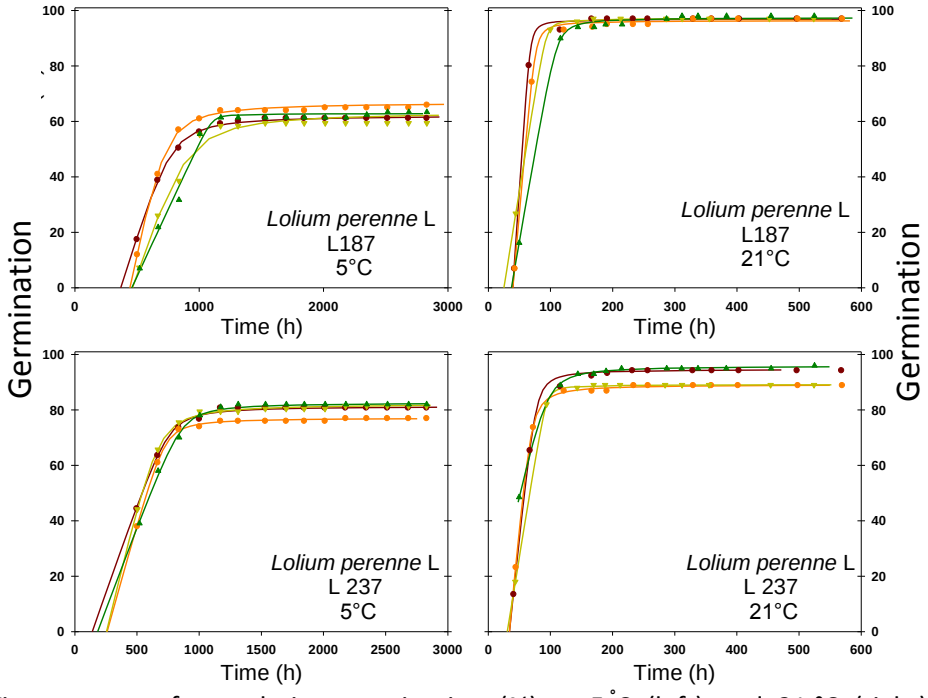


Figure 5. Time course of cumulative germination (%) at 5 °C (left) and 21 °C (right) for Type-5 accessions (i.e. accessions with high germinability that differed between 5 and 21 °C and had a fast germination rate at 21 °C). The results are presented for the two wild-grass accessions (L187 and L237) that belonged to this group. The x-axe scales differ among graphs.

Type 6 of germination dynamics – high germinability, slow germination and germinability varying across temperatures

Only one accession of *L. perenne* (L408) belonged to the last germination type. This accession had relatively high final germination percentage at 21 °C (*ca*. 90 %), which significantly decreased ($P < 0.01$) for the 5 °C temperature treatment (**Figure 6**). Further, this accession showed a slow germination rate at 21 °C with more than 240 h needed to reach 95 % of its final germination. As expected, germination at 5 °C was even slower than at 21 °C (Table 2). High variability was observed between replicates at 5 °C.

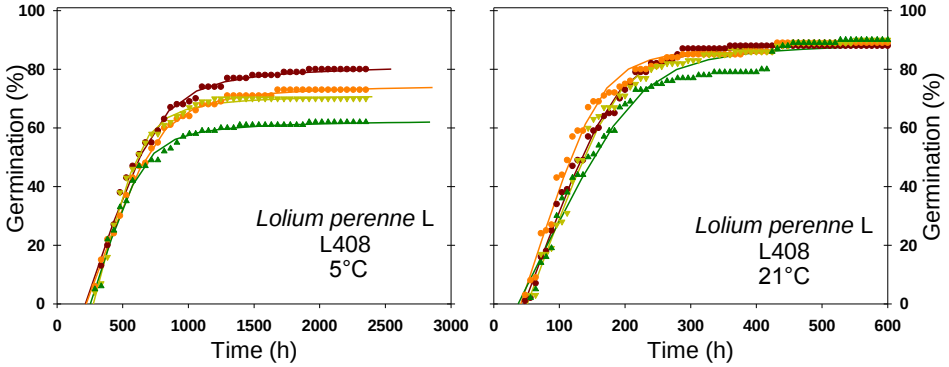


Figure 6. Time course of cumulative germination (%) at 5 °C (left) and 21 °C (right) for Type-6 accessions (i.e. accessions with high germinability that differed between 5 and 21 °C and had a slow germination rate at 21 °C). The results are presented for the only wild-grass accession (L498) that belonged to this group. The x-axe scales differ among graphs.

4.4. Potential artefacts in measuring germinability

One of the major findings in this work concerns the risk of misestimating germinability at low temperature when non-adapted protocols are adopted. Regardless of the species and maximum potential germinability, observing seed lots for only 14 d (336 h) or even for 50 d (1200 h) leads to underestimate the potential of germination at low temperature (**Figure 7**). However, the question arises of how inaccurate can the results be? In this study, underestimations of germinability at 5 °C ranged from *ca*. 40% (L030) to 100% in the 14-d test, and from a few points (less than 5%) up-to 75% in the 50-d test.

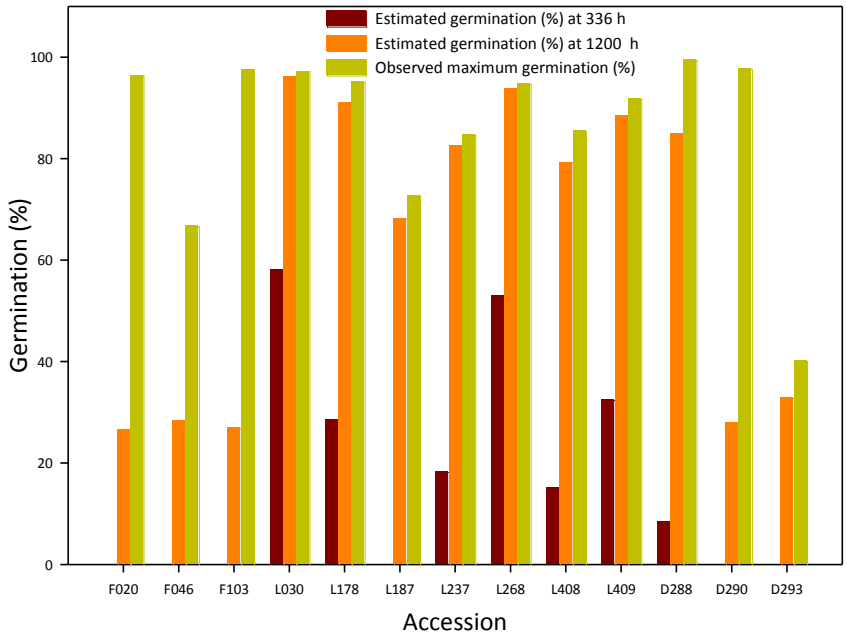


Figure 7. Effects of the observation period (336 h, 1200 h and "as long as needed to obtain maximum germination") on estimated germinability at 5 °C of thirteen accessions of cool-season grasses.

5. DISCUSSION

The effects of temperature on the germination rate of an individual seed and of lots of seed have been studied for long time (e.g. Sachs, 1860) but remains a major topical issue in agronomy and ecology with theoretical and practical outcomes (Ahmed, 2015; Andreucci et al., 2016; Baskin and Baskin, 2014; Larsen and Bibby, 2005).

The results of this study highlighted that the effects of temperature were greater on germination rate than on germinability. As expected, germination rates were faster at 21 °C than at 5 °C. However, the genotypic variability found for the ratio of germination rates between the two temperatures was extremely more variable that what is found in the literature for perennial cool-season grasses (Butler et al., 2017; Larsen and Bibby, 2005; Lonati et al., 2009; Zhang et al., 2013). Further, the range of germination-rate ratios was different between the three perennial grasses, extending from 4 to 11 for *L. perenne*, 5 to 21 in *D. glomerata,* up to 7 to 40 for *F. arundinace*. These values possibly illustrate part of the range of genetic variability within each species related to the pedo-climatic conditions of their growing habitats (Inda et al., 2014; Blanco-Pastor et al., al 2019, Durand et al., 2010; Zaka et al., 2017). This is a hypothesis that merits to be still tested.

Temperature had a marked effect on the time seeds needed for start germination. Seeds at 5 °C needed longer to start germinating than at 21 °C (Table 2). This is consistent with Sharifiamina et al. (2016) study, where seeds of tall fescue started germination after 30 days at 5 °C while most seeds germinated between 3 and 10 days at 25 °C.

A consequence of the extreme differences in germination rates at 5 °C and 21 °C is that seeds at 5 °C needed more time to express their maximum germination capacity. One of our major findings concerns the potential for underestimate germinability at low temperature when non-adapted protocols are adopted. Seeds at 5 °C needed up to 18 times longer to reach the germination percentage they reached at 21 °C. This fact casts doubts on the validity of conclusions withdrawn in many studies where germination experiments were performed for a period of time insufficient to obtain full germination at low temperatures (e.g. Butler et al 2017). For instance, for the three perennial cool-season grasses we studied at 5 °C, even a 50-d experiment would have yielded in misleading results. These results do not apply to wheat which germinated very rapidly under both cold and optimal conditions (**Figure 1**), and for which our results are similar to those in the literature (Monks et al., 2009; Moot et al., 2000).

Thomson (1970) pointed out that "*in ecological studies … a sound method for comparing germination responses is essential before progress can be made in comparing responses of different species in relation to habitat or distribution*". The experimental protocol followed in this study allowed demonstrating that, within the four studied species no significant differences were observed in the germinability response to 5 and 21 °C (Table 4), except for three *L. perenne* accessions (Types 5 and 6; **Figures 5** and **6**). Overall, twelve of the fifteen studied accessions showed an ability to reach the same final germination percentage at 5 and 21 °C, when given enough time. With a few exceptions (Moot et al., 2000), this is completely different from the conclusion drawn from most of the experimental works on grasses germination (Table 1).

Finally, estimates of lower cardinal temperature and base temperature for thermal time modelling could be negatively impacted by erroneous quantification of germinability and the time course of germination at low temperature (Sachs, 1860; Thomson, 1970). Many of the findings reported in literature, particularly those concerned with varieties and species comparisons, could be reanalysed bearing in mind that the experimental protocol is of paramount importance, especially in ecology studies (Thomson, 1970).

6. CONCLUSION

The objective of this study was to determine the effects of low constant temperature on the time needed to express the full germination capacity of seed lots of three species of cool-season grasses and wheat. As expected, germination rates were faster at 21 °C than at 5 °C. Consequently, seeds at 5 °C needed longer (up to 21 times) to reach the maximum germinability. Accessions of wheat, a highly domesticated species, germinated much faster at 21 °C that most of the wild accession of cool-season grasses. One of the major findings in this work concerns the risk of misestimating germinability at low temperature when non-adapted protocols are adopted. While the time needed to express full germination capacity greatly vary with temperature, in most cases, no significant differences were observed in the germinability response to temperature. Most accessions expressed 90-99% germinability at both cold and near-optimum temperatures, while a few accessions had a low germinability at both temperatures. On the other hand, only a few accessions exhibited significant differences in their germinability at 5 and 21 °C.

Under the paradigm of cardinal temperatures (e.g. Sachs, 1860) shaping germination rates, and consequently the appropriateness of experimental protocols and the

interpretation of results, the next questions to answer concern the dynamics of germinations in the vicinity of the maximum temperature allowing this process. Answering these questions for each species is unavoidable, in our views, prior to any attempt to study the genetic-related diversity both within and between species. The knowledge drawn from studies on germination at temperature close to the edges of species ranges is also important for seed bank curators and for biodiversity preservation and management.

Conclusion et perspectives

Cette thèse a été réalisée en poursuivant deux objectifs : i) d'analyser la diversité génétique de la réponse germinative à la température chez des populations de trois espèces de graminées fourragères pérennes, le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), la fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) et le dactyle (*Dactylis glomerata* L.), et ii) analyser la diversité génétique de la réponse germinative à la température chez deux espèces domestiquées de graminées annuels, le blé (*Triticum aestivum* L.) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.), afin de comparer ces réponses avec celles de nos graminées fourragères pérennes.

Nos résultats montrent qu'au sein de chaque espèce de graminées fourragères étudiées, il existe de la variabilité génétique entre les lots pour leurs réponses germinatives à la température. Les différents types de réponses à la température qui ont été distingué dans cette étude, reflètent la variabilité génétique existant au sein de chaque espèce. Cette variabilité génétique concerne aussi bien le temps de début de germination (*tc*), la vitesse maximale de germination (α) et le temps nécessaire pur attendre 95 % de la germination finale ($t_{95\%}$). Par contre, au sein de deux espèces de graminées annuelles, les graines n'ont pas montré des différences dans leurs réponses à la température. Ces graines ont eu une forte capacité germinative à toutes les températures et elles ont eu une grande vitesse de germination en comparaison avec les espèces graminées fourragères pérennes étudiées. Ces contrastes suggèrent que des caractères physiologiques associés à l'absence de dormance ont pu été sélectionnés chez les espèces très domestiques tels que le blé et l'orge. Ces caractères, qui donneraient des avantages adaptatives face aux conditionnes de température défavorables pour la germination, seraient encore présents chez certaines populations des fourragères pérennes.

Nous avons montré qu'Il existe un fort effet de l'âge des lots de graines de ray-grass anglais sur la réponse germinative à la température. Les pourcentages de germination diminuent avec l'augmentation de la durée de stockage des graines. De plus, pour des durées de stockage égales, il y a eu un effet du lieu de conservation sur la germination en réponse à la température, même si les consignes de stockage étaient les mêmes. Ces effets étaient plus manifestes pour la germination à des températures extrêmes telles que 5 et 32 °C.

Nos hypothèses ont été confirmées. Nos résultats démontrent que les graines incubées à basse température constante germent aussi bien que les graines à température constante proche de l'optimale, à condition qu'elles aient suffisamment de temps pour germer. Pour atteindre le potentiel de germination maximale, certains lots de graines de graminées fourragères avaient besoin de beaucoup plus de temps (jusqu'à 27 fois) à 5 °C qu'à température proche de l'optimale.

Nous avons montré que les différences de capacité germinative en fonction de la température pouvaient en partie être d'origine génétique et de ce fait qu'il pouvait être possible de sélectionner pour une capacité à germer ou pas à une température donnée.

La comparaison des fréquences alléliques pour de nombreux marqueurs répartis sur le génome entre les individus germant et ceux ne germant pas à différentes températures a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la capacité des individus à germer à ces températures. L'effet de ces gènes reste à être validé, par exemple, par des études d'expression ou par l'étude de populations crées par sélection pour porter des allèles contrastés.

Finalement, afin d'étudier l'effet de la sélection divergente sur la capacité germinative en fonction de la température, des tests sont actuellement en cours pour analyser la capacité germinative à différentes températures de 5 à 32 °C sur toutes les populations obtenues des sélections divergentes positives et négatives. L'analyse ultérieure de ces résultats doit offrir des nouvelles perspectives pour la création de variétés de graminées fourragères et à gazon adaptées aux futures conditions climatiques.

Références bibliographiques

Abdi, H., and Williams, L.J. (2010). Principal component analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2, 433–459.

Adler, P.B., and HilleRisLambers, J. (2008). The Influence of Climate and Species Composition on the Population Dynamics of Ten Prairie Forbs. Ecology *89*, 3049–3060. doi: 10.1890/07-1569.1.

Agreste (2010). La moitié des surfaces semée depuis au moins trois ans. Les Dossiers N°8 - JUILLET 2010.

Ahmed L. (2015). Analysis of inter- and -intra specific variability of five pasture species in response to temperature during germination and initial heterotrophic growth. PhD Thesis, University of Poitiers, France.

Alex, D.V., Bert, van G., and Belgium, I. (2010). Report on roles and utility of grassland in Europe. Food, Agriculture and Fisheries, Biotechnology. DLO. 58.

Ali, M., Rahman, M., and Ahammad, K. (2015). Effect of relative humidity, initial seed moisture content and storage container on soybean (*Glycine max L. Meril.*) seed quality. Bangladesh J. Agril. Res. 39(3): 461-469.

Andreucci, M.P., Moot, D.J., Black, A.D., and Sedcole, R. (2016). A comparison of cardinal temperatures estimated by linear and nonlinear models for germination and bulb growth of forage brassicas. Eur. J. Agron. 81, 52–63. doi : 10.1016/j.eja.2016.08.010.

Argyris, J., Truco, M.J., Ochoa, O., Knapp, S.J., Still, D.W., Lenssen, G.M., Schut, J.W., Michelmore, R.W., and Bradford, K.J. (2005). Quantitative trait *loci* associated with seed and seedling traits in Lactuca. Theor. Appl. Genet. 111, 1365–1376. Doi: 0.1007/s00122-005-0066-4

Argyris, J., Truco, M.J., Ochoa, O., McHale, L., Dahal, P., Van Deynze, A., Michelmore, R.W., and Bradford, K.J. (2011). A gene encoding an abscisic acid biosynthetic enzyme (LsNCED4) collocates with the high temperature germination locus Htg6.1 in lettuce (Lactuca sp.). Theor. Appl. Genet. 122, 95–108. doi: 10.1007/s00122-010-1425-3.

Baert J, Van Waes C. (2014). Improvement of the digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) inspired by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). EGF at 50: The future of European grasslands. Proceedings of the 25th General Meeting of the European Grassland Federation, Aberystwyth, Wales, 7-11 September 2014. IBERS. University Aberystwyth, 172-174.

Barre P, Emile JC, Betin M, Surault F, Ghesquière M, Hazard L. (2006). Morphological Characteristics of Perennial Ryegrass Leaves that Influence Short-Term Intake in Dairy Cows. Agronomy Journal. 98: 978-985.

Baskin, C.C., and Baskin, J.M. (1988). Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. American Journal of Botany *75*, 286–305. doi: 10.1002/j.1537-2197.1988.tb13441.

Baskin, C.C., and Baskin, J.M. (1998). Seeds: Ecology, Biogeography, and, Evolution of Dormancy and Germination (Elsevier).

Baskin CC, Baskin JM. (2003). When breaking seed dormancy is a problem try a move along experiment. Native Plants Journal. 4: 17-21.

Baskin, J.M., and Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. Seed Science Research 14. Doi: 10.1079/SSR2003150.

Baskin, C.C., and Baskin, J.M. (2014). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination (San Diego, CA: Elsevier/AP).

Beard, J.B. (1973). Turfgrass: Science and culture. Prentice Hall Inc.,Englewood Cliffs, NJ.

Benech-Arnold RL, Sánchez RA, Forcella F, Kruk BC, Ghersa CM. (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. Field Crops Research. 67: 105-122.

Bentsink, L., Jowett, J., Hanhart, C.J., and Koornneef, M. (2006). Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. PNAS *103*, 17042–17047. Doi: 10.1073/pnas.0607877103.

Bewley, J.D., and Black, M. (1994). Seeds: physiology of development and germination (New York: Plenum Press), pp. 1–33.

Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. The Plant Cell. 9, 1055-1066.

Bewley, J.D. (2001). Seed germination and reserve mobilization. Encyclopedia of life sciences. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0002047/full

Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., and Nonogaki, H. (2013). Seeds: physiology of development, germination and dormancy. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4.

Blanco-Pastor JL, Manel S, Barre P, et al. (2019). Pleistocene climate changes, and not agriculturalspread, accounts for range expansion and admixture in the dominant grassland species Lolium perenne L. J Biogeogr. 00:1–15. https ://doi.org/10.1111/jbi.13587.

Bonos, S.A., Rush, D., Hignight, K., and Meyer, W.A. (2004). Selection for Deep Root Production in Tall Fescue and Perennial Ryegrass. Crop Science 44, 1770. Doi: 10.2135/cropsci2004.1770

Bove Jérôme, and Marc Jullien and Philippe Grappin (2001). Functional genomics in the study of seed germinationf. Genome Biology. 3(1):reviews1002.1–1002.5. http://genomebiology.com/2001/3/1/reviews/1002.

Brändel, M. (2004). The role of temperature in the regulation of dormancy and germination of two related summer-annual mudflat species. Aquatic Botany *79*, 15–32. doi:10.1016/j.aquabot.2003.11.008.

Butler , T.J., Celen, A.E., Webb, S.L., Krstic, D.B., and Interrante, S.M. (2015). Temperature affects the germination of forage legume seeds. Crop Sci. 54, 2846–2853. doi: 10.2135/cropsci2014.01.0063.

Butler, T.J., Celen, A.E., Webb, S.L., Krstic, D.B., and Interrante, S.M. (2017). Germination in Cool-Season Forage Grasses under a Range of Temperatures. Crop Science 57, 1725–1731. doi: 10.2135/cropsci2015.10.0647.

Byrne, S.L., Nagy, I., Pfeifer, M., Armstead, I., Swain, S., Studer, B., Mayer, K., Campbell, J.D., Czaban, A., Hentrup, S., et al. (2015). A synteny-based draft genome sequence of the forage grass Lolium perenne. Plant J. 84, 816–826. doi : 10.1111/tpj.13037.

Cao, T. (1978). Germination des graines produites par les plantes de deux lignées *d'Oldenlandia coymbosa* L. (Rubiacées) cultivées dans des conditions contrôlées. Physiologie Végétale. 16 (3) 521-531.

Chiang, G.C., Barua, D., Kramer, E.M., Amasino, R.M., and Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 11661–11666. www.pnas.org/cgi/content/full/0901367106/DCSupplemental.

Chiang, G.C., Bartsch, M., Barua, D., Nakabayashi, K., Debieu, M., Kronholm, I., Koornneef, M., Soppe, W.J., Donohue, K., and de Meaux, J. (2011). DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in Arabidopsis thaliana. Molecular Ecology. 20, 3336–3349. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05181.x.

Christians N. (2004). Cool-season grasses. In: Fundamentals of turfgrass management, (2nd Eds) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ: 33-58. In: Hulke BS, Bushman BS, Watkins E, Ehlke NJ. 2012. Association of freezing tolerance to LpCBFIIIb and LpCBFIIIc gene polymorphism in perennial ryegrass accessions. Crop Science. 52: 2023-2029.

Combes, D., Litrico, I., Barre, P., Gutiérrez, A.E., Rodriguez, L.S., and Louarn, G. (2015). Effets de l'intensité de la défoliation sur la composition génétique et phénotypique d'une population virtuelle de ray-grass. In Colloque Présentant Les Méthodes et Résultats Du Projet Climagie (Métaprogramme ACCAF), (INRA), pp. 223–p.

Copeland, L.O., and McDonald, M.B. (2001). Principles of Seed Science and Technology. 4rd Edition. Kluwer Academic Publishers. doi : 10.1007/978-1-4615-1619-4.

Dafwa PS. (2006). Perennial ryegrass (*Lolium perenne*). In: Moore G, Sanford P, Wiley T. Perennial pastures for Western Australia, Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.

Deru J, Van Eekeren N, De Boer H. (2012). Rooting density of three grass species and eight Lolium perenne cultivars. Grassland-a European resource? Proceedings of the 24th General Meeting of the European Grassland Federation, Lublin, Poland, 3-7 June 2012: 604-606.

Do Cao T., Attims Y., Corbineau F., Côme D. (1978). Germination des graines produites par les plantes de deux lignées d'Oldenlandia corymbosa L. (Rubiacées) cultivées dans des conditions contrôlées. Physiol. Vég., 16, 521-531.

Donohue, K. (2002). Germination Timing Influences Natural Selection on Life-History Characters in Arabidopsis Thaliana. Ecology 83, 1006–1016. doi: 10.1890/0012-9658(2002)083[1006:GTINSO]2.0.CO;2.

Donohue, K., Heschel, M.S., Butler, C.M., Barua, D., Sharrock, R.A., Whitelam, G.C., and Chiang, G.C. (2008). Diversification of phytochrome contributions to germination as a function of seed-maturation environment. New Phytol. 177, 367–379. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02281.x.

Doyle, J.J., and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 39–40.

Durand J.L., Bernard F., Lardy R., Graux A.I. (2010). Changement climatique et prairie : l'essentiel des impacts. In Brisson N., Levrault F. (eds.), Livre vert du projet CLIMATOR - Changement climatique, agriculture et forêt en France : simulations d'impacts sur les principales espèces ; ADEME, Juin 2010 ; pages 181-190.

E. L. Breese (1989). Regeneration and Multiplication of Germplasm Resources in Seed Genebanks: the Scientific Background. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H. (1985). Sequential germination test plans and summary of preferred germination test procedures. *Handbook of seed technology for genebanks*. Vol I . Principles and methodology. Chapter 15, pp. 179–206. Rome, IBPGR.

Ellis, R.H. (1991). The Longevity of Seeds. Hortscience VoL. 26, 7.

Ellis, R.H., Nasehzadeh, M., Hanson, J., and Woldemariam, Y. (2017). Medium-term seed storage of 50 genera of forage legumes and evidence-based genebank monitoring intervals. Genetic Resources and Crop Evolution 65, 607–623. doi: 10.1007/s10722-017-0558-5.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, et al. (2011) A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. PLoS ONE 6(5): e19379. doi: 10.1371/journal.pone.0019379.

Eriksson, O. (2002). Ontogenetic niche shifts and their implications for recruitment in three clonal Vaccinium shrubs: Vaccinium myrtillus, Vaccinium vitis-idaea, and Vaccinium oxycoccos. Can. J. Bot. 80, 635–641. doi: 10.1139/B02-044.

Escobar-Gutiérrez, A.J., Daudet, F.-A., Guadillère, J.-P., Maillard, P., and Frossard, J.-S. (1998). Modelling of Allocation and Balance of Carbon in Walnut (*Juglans regia*L.) Seedlings during Heterotrophy-autotrophy Transition. Journal of Theoretical Biology *194*, 29–47. https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0740

Evans, A.S., and Cabin, R.J. (1995). Can Dormancy Affect the Evolution of Post-Germination Traits? The Case of Lesquerella Fendleri. Ecology 76, 344–356. https://doi.org/10.2307/1941194.

Eurostat. 2017. Data Base. http://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database.

FAO (2010) The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO (2013). Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Feitosa SS, Davide AC, Tonetti OAO, Fabricante JR, Lui JJ (2009). Estudos de viabilidade de sementes de candeia *eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish por meio de testes de germinação e raios x. Floresta, 39 : 393-399.

Fenner, M. (1991). The effects of the parent environment on seed germinability. Seed Sci. Res. 1, 75–84. doi: 10.1017/S0960258500000696

Fenner, M. (2000). Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities (CABI).2nd edition.

Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. New Phytol. 171, 501–523. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.

Fjellheim, S., Boden, S., and Trevaskis, B. (2014). The role of seasonal flowering responses in adaptation of grasses to temperate climates. Front. Plant Sci. 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00431.

Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H., and Finch-Savage, W.E. (2011). Dormancy cycling in Arabidopsis seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 20236–20241. www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1116325108/-/DCSupplemental.

Footitt, S., Huang, Z., Clay, H.A., Mead, A., and Finch-Savage, W.E. (2013). Temperature, light and nitrate sensing coordinate A rabidopsis seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. Plant J. 74, 1003–1015. doi: 10.1111/tpj.12186.

Fujino, K., Sekiguchi, H., Matsuda, Y., Sugimoto, K., Ono, K., and Yano, M. (2008). Molecular identification of a major quantitative trait locus, qLTG3–1, controlling low-temperature germinability in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 12623–12628. www.pnas.org/cgi/content/full/05303105/DCSupplemental.

Garbutt, K., and Witcombe, J.R. (1986). The inheritance of seed dormancy in Sinapis arvensis L. Heredity 56, 25–31. doi: 10.1038/hdy.1986.5.

Garoma, B., Chibsa, T., Keno, T., and Denbi, Y. (2017). Effect of Storage Period on Seed Germination of Different Maize Parental Lines. Journal of Natural Sciences Research. Vol.7, No.4.

Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., and Soppe, W.J.J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. Plant Cell Environ. 35, 1769–1786. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x.

Graeber, K., Linkies, A., Steinbrecher, T., Mummenhoff, K., Tarkowska, D., Ture kova, V., Ignatz, M., Sperber, K., Voegele, A., de Jong, H., et al. (2014). DELAY OF GERMINATION 1 mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature- and gibberellin-dependent control of seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, E3571–E3580. www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1403851111/-/DCSupplemental.

Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., and Jullien, M. (2000). Control of seed dormancy in Nicotiana plumbaginifolia: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. Planta 210, 279–285. doi: 10.1007/PL00008135.

Green, B.H. (1990). Agricultural intensification and the loss of habitat, species and amenity in British grasslands: a review of historical change and assessment of future prospects+. Grass and Forage Science *45*, 365–372. doi: 10.1111/j.1365-2494.1990.tb01961.x.

Grime JP, Mason G, Curtis AV, Rodman J, Band SR. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. The Journal of Ecology. 69: 1017-1059. doi: 10.2307/2403382.

Grzegorz Zurek (1999). Effect of seed storage on germplasm integrity of of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). Genetic Resources and Crop Evolution 46: 485–490.

Gu, X.-Y., Kianian, S.F., and Foley, M.E. (2006). Dormancy genes from weedy rice respond divergently to seed development environments. Genetics 172, 1199–1211. doi: 10.1534/genetics.105.049155.

Hand, M.L., Cogan, N.O.I., and Forster, J.W. (2012). Molecular characterisation and interpretation of genetic diversity within globally distributed germplasm collections of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and meadow fescue (*F. pratensis* Huds.). Theoretical and Applied Genetics *124*, 1127–1137. doi: 10.1007/s00122-011-1774-6.

Hannaway D, Fransen S, Cropper JB, Teel M, Chaney M, Griggs TD, Halse RR, Hart JM, Cheeke PR, Hansen DE, Klinger R, Lane W. (1999). Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). PNW. 503: 1-20. https://www.researchgate.net/publication/45793996.

He, H., de Souza Vidigal, D., Snoek, L.B., Schnabel, S., Nijveen, H., Hilhorst, H., and Bentsink, L. (2014). Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany *65*, 6603–6615. doi:10.1093/jxb/eru378.

Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M.C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P.G., Finn, J.A., Freitas, H., Giller, P.S., Good, J., et al. (1999). Plant Diversity and Productivity Experiments in European Grasslands. Science *286*, 1123–1127. doi: 10.1126/science.286.5442.1123

Hermann, K., Meinhard, J., Dobrev, P., Linkies, A., Pesek, B., Heß, B., Macháčková, I., Fischer, U., and Leubner-Metzger, G. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (Beta vulgaris L.): a comparative study of fruits and seeds. Journal of Experimental Botany *58*, 3047–3060. doi:10.1093/jxb/erm162.

Heschel, M.S., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G.C., Sharrock, R.A., and Donohue, K. (2007). A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. New Phytol. 174, 735–741. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02044.x.

Hill, M., Pearson, C., and Kirby, A. (1985). Germination and seedling growth of prairie grass, tall fescue and Italian ryegrass at different temperatures. Australian Journal of Agricultural Research 36, 13. doi: 10.1071/AR9850013.

Hilu, K.W., and De Wet, J.M.J. (1980). Effect of artificial selection on grain dormancy in Eleusine (Gramineae). Systematic Botany. 54–60. doi: 10.2307/2418735.

Holdsworth, M., Kurup, S., and MKibbin, R. (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. Trends Plant Sci. 4, 275–280. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01429-6.

Holdsworth, M., Lenton, J., Flintham, J., Gale, M., Kurup, S., McKibbin, R., Bailey, P., Larner, V., and Russell, L. (2001). Genetic control mechanisms regulating the initiation of germination. J. Plant Physiol. 158, 439–445. doi: 10.1078/0176-1617-00355.

Hughes, L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? Trends in Ecology & Evolution 15, 56–61. doi: 10.1016/S0169-5347(99)01764-4.

Huo, H., Dahal, P., Kunusoth, K., McCallum, C.M., and Bradford, K.J. (2013). Expression of 9-cis-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE4 is essential for thermoinhibition of lettuce seed germination but not for seed development or stress tolerance. Plant Cell 25, 884–900. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.108902.

Huyghe C, de Vliegher A, Golinski P. (2014). European grasslands overview temperate region. EGF at 50: The future of European grasslands. Proceedings of the 25th General Meeting of the European Grassland Federation, Aberystwyth, Wales, 7-11 September 2014. IBERS. University Aberystwyth, 29-40.

Inda, L. A., Sanmartín, I. , Buerki, S. , Catalán, P. and Katinas, L. (2014), Mediterranean origin and Miocene–Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca subgenus* Schedonorus and *Lolium*). Journal of BiogeographyJ. Biogeogr., 41: 600-614. doi:10.1111/jbi.12211.

IPCC. (2014). International panel on climatic changes. Fifth assessment report (AR5). IPCC. Recorded Press Conference (Working Group III Report, Berlin).

JG, H., and JFL, C. (1987). Temperature effects on the germination of herbage legumes in New Zealand. In Proceedings of the New Zealand Grassland Association, pp. 177–183.

Jong JuH. (2003). Seasonal variation and environmental effects on endophyte transmission in tall fescue. PhD, Thesis, University of Georgia, Athens, UAS.

Keddy, P.A. (1992). Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. Journal of Vegetation Science *3*, 157–164. doi: 10.2307/3235676

Kendall, S.L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I.A., and Penfield, S. (2011). Induction of Dormancy in Arabidopsis Summer Annuals Requires Parallel Regulation of DOG1 and Hormone Metabolism by Low Temperature and CBF Transcription Factors. Plant Cell 23, 2568–2580. doi: 10.1105/tpc.111.087643

Kendall, S. (2012). Temperature regulation of seed dormancy and germination in Arabidopsis thaliana. PhD Thesis, University of York.

Klos, K.L.E., and Brummer, E.C. (2000). Response of Six Alfalfa Populations to Selection under Laboratory Conditions for Germination and Seedling Vigor at Low Temperatures. Crop Sci. 40, 959–964. doi: 10.2135/cropsci2000.404959x.

Koornneef, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. Current Opinion in Plant Biology *5*, 33–36.

Lal, R. (2004). Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. Science *304*, 1623–1627. doi : 10.1126/science.1097396.

Larsen, S.U., and Bibby, B.M. (2005). Differences in Thermal Time Requirement for Germination of Three Turfgrass Species. Crop Sci. 45, 2030. doi:10.2135/cropsci2004.0731.

Linkies, A., and Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. Plant Cell Rep *31*, 253–270. doi : 10.1007/s00299-011-1180-1.

Litrico, I., Barre, P., Durand, J.-L., Ghesquière, M., Prieto, I., and Violle, C. (2015). Diversité spécifique et génétique dans les prairies semées: une plus-value complémentaire! In Colloque Présentant Les Méthodes et Résultats Du Projet Climagie (Métaprogramme ACCAF), (INRA), pp. 223–p.

Lonati, M., Moot, D.J., Aceto, P., Cavallero, A., and Lucas, R.J. (2009). Thermal time requirements for germination, emergence and seedling development of adventive legume and grass species. New Zealand Journal of Agricultural Research 52, 17–29. doi:10.1080/00288230909510485.

Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, L., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Cherry, H., and Finch-Savage, W.E. (2015). The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise: The ecophysiology of seed persistence. Biological Reviews *90*, 31–59. doi: 10.1111/brv.12095.

Lu, H., Shen, J., Jin, X., Hannaway, D.B., Daly, C., and Halbleib, M.D. (2008). Determining optimal seeding times for tall fescue using germination studies and spatial climate analysis. Agric. For. Meteorol. 148, 931–941. doi:10.1016/j.agrformet.2008.01.004.

McGinnies, W.J. (1960). Effects of Moisture Stress and Temperature on Germination of Six Range Grasses. Agronomy Journal 52, 159–162. doi: 10.2134/agronj1960.00021962005200030012x.

Meyer, S.E., Allen, P.S., and Beckstead, J. (1997). Seed Germination Regulation in Bromus tectorum (Poaceae) and Its Ecological Significance. Oikos *78*, 475. doi: 10.2307/3545609.

Miao, S., Edelstein, C., Carstenn, S., and Gu, B. (2010). Immediate ecological impacts of a prescribed fire on a cattail-dominated wetland in Florida Everglades. Fundam. Appl. Limnol. Arch. Für Hydrobiol. 176, 29–41. doi: 10.1127/1863-9135/2010/0176-0029.

Miransari, M., and Smith, D.L. (2014). Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany *99*, 110–121. http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005.

Monks, D.P., SadatAsilan, K., Moot, D.J., and others (2009). Cardinal temperatures and thermal time requirements for germination of annual and perennial temperate pasture species. Agronomy New Zealand 39, 95–110.

Moot, D.J., Scott, W.R., Roy, A.M., and Nicholls, A.C. (2000). Base temperature and thermal time requirements for germination and emergence of temperate pasture species. New Zealand Journal of Agricultural Research, 43:1, 15-25, doi: 10.1080/00288233.2000.9513404

Morgan J. W. & Lunt I. D. (1994) Germination characteristics of eight common grassland and woodland forbs. The Victorian Naturalist 11, 10-17.

Murata, M. (1991). Cytogenetic Changes During Seed Storage. In Developments in Plant Genetics and Breeding, (Elsevier), pp. 211–228.

Naeem, S., Thompson, L.J., Lawler, S.P., Lawton, J.H., Woodfin, R.M., and others (1994). Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. Nature *368*, 734–737.

Nagel, M., and Börner, A. (2010). The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. Seed Science Research 20, 1. doi:10.1017/S0960258509990213.

Nakabayashi, K., Bartsch, M., Xiang, Y., Miatton, E., Pellengahr, S., Yano, R., Seo, M., and Soppe, W.J.J. (2012). The Time Required for Dormancy Release in Arabidopsis Is Determined by DELAY OF GERMINATION1 Protein Levels in Freshly Harvested Seeds. Plant Cell 24, 2826–2838. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.100214.

Nakamura, S., Pourkheirandish, M., Morishige, H., Kubo, Y., Nakamura, M., Ichimura, K., Seo, S., Kanamori, H., Wu, J., Ando, T., et al. (2016). Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3 Regulates Seed Dormancy in Barley. Current Biology 26, 775–781. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.024

Nash, J.E., and Sutcliffe, J.V. (1970). River flow forecasting through conceptual models part I — A discussion of principles. Journal of Hydrology 10, 282–290. doi: 10.1016/0022-1694(70)90255-6.

Nasreen, S. (2000). Effect of storage temperature, storage period and seed moisture content on seed viability of Mash Bean (Vigna mango). Pakistan Journal of Biological Science, 3 (3): 513-514.

Naylor, J.M., and Jana, S. (1976). Genetic adaptation for seed dormancy in Avena fatua. Can. J. Bot. 54, 306–312.

Née, G., Xiang, Y., and Soppe, W.J. (2017). The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. Current Opinion in Plant Biology *35*, 8–14. http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.002.

Nikolaeva, M.G. (1969). Physiology of deep dormancy in seeds. Leningrad, Russia, Izdatel'stvo 'Nauka'. (Translated from Russian by Z. Shapiro, National Science Foundation, Washington, DC.)

Nikolaeva, M.G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. pp. 51–74 *in* Khan, A.A. (Ed.) The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, North-Holland.

Nori, H., Moot, D., and Black, A. (2014). Thermal time requirements for germination of four annual clover species. New Zealand Journal of Agricultural Research, 57:1, 30-37. doi:10.1080/00288233.2013.863786.

Nunes, F.P., Dayrell, R.L.C., Silveira, F.A.O., Negreiros, D., Santana, D.G., Carvalho, F.J., Garcia, Q.S., and Fernandes, G.W. (2016). Seed germination ecology in rupestrian grasslands. In Ecology and conservation of mountain-top grasslands in Brazil. Edited by G.W. Fernandes. Springer International, Cham, Baviera, Germany. pp. 207–226. doi: 10.1007/978-3-319-29808-5_10

Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.-I., and Choi, G. (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. Plant J. 47, 124–139. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02773.x.

Onyekwelu, J.C., and Fayose, O.J. (2007). Effect of Storage Methods on the Germination and Proximate Composition of *Treculia africana* Seeds. Conference on International Agricultural Research for Development. University of Kassel-Witzenhausen andUniversity of Göttingen.

Palazzo, A.J., and Brar, G.S. (1997). The Effects of Temperature on Germination of Eleven Festuca Cultivars. US Army Corp of Eng. Spec. Rep. 97-19.

Pauly, L., Flajoulot, S., Garon, J., Julier, B., Béguier, V., and Barre, P. (2012). Detection of favorable alleles for plant height and crown rust tolerance in three connected populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theor. Appl. Genet. 124, 1139–1153. doi:10.1007/s00122-011-1775-5.

Peeters A. (2004). Natural and sown grasses. Profiles of a temperature species selection ecology, biodiversity and use. FAO. Blackwell: 198-206.

Peeters, A. (2009). Importance, evolution, environmental impact and future challenges of grasslands and grassland-based systems in Europe. Grassland Science *55*, 113–125. doi: 10.1111/j.1744-697X.2009.00154.x.

Penkova, T.G. (2017). Principal component analysis and cluster analysis for evaluating the natural and anthropogenic territory safety. Procedia Computer Science 112, 99–108. doi: 10.1016/j.procs.2017.08.179.

Potokina, E., Sreenivasulu, N., Altschmied, L., Michalek, W., and Graner, A. (2002). Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). Funct. Integr. Genomics 2, 28–39. Doi: 10.1007/s10142-002-0050-x.

Pradhan, B.K., and Badola, H.K. (2008). Seed germination response of populations of Swertia chirayita [(Roxb. ex Fleming) H. Karst] following periodical storage. Seed Technology 63–69.

Pradhan, B.K., and Badola, H.K. (2012). Effect of Storage Conditions and Storage Periods on Seed Germination in Eleven Populations of Swertia chirayita: A Critically Endangered Medicinal Herb in Himalaya. doi:10.1100/2012/128105.

Reed, S.M. (2005). Effect of Storage Temperature and Seed Moisture on Germination of Stored Flowering Dogwood Seed. J. Environ. Hort. 23(1):29–32.

Richardson, W.C., Whitaker, D.R., Sant, K.P., Barney, N.S., Call, R.S., Roundy, B.A., Aanderud, Z.T., and Madsen, M.D. (2018). Use of auto-germ to model germination timing in the sagebrush-steppe. Ecology and Evolution 8, 11533–11542. doi: 10.1002/ece3.4591

Roberts, E.H. (1987). Temperature and seed germination. In Symposia of the Society for Experimental Biology, pp. 109–132.

Roos, E.E. (1984). Genetic Shifts in Mixed Bean Populations. II. Effects of Regeneration 1. Crop Science 24, 711–715. doi: 10.2135/cropsci1984.0011183X002400040020x.

Sachs, J. 1860. Die abhängigkeit de keimgung von der temperatur. Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik : Band 2. pp 338-377.

Sato, K., Yamane, M., Yamaji, N., Kanamori, H., Tagiri, A., Schwerdt, J.G., Fincher, G.B., Matsumoto, T., Takeda, K., and Komatsuda, T. (2016). Alanine aminotransferase controls seed dormancy in barley. *Nature Communications*, *7*, [11625]. https://doi.org/10.1038/ncomms11625

Scharpf, Robert F. (1970). Seed viability, germination, and radicle growth of dwarf mistletoe in California. Berkeley, Calif. Pacific SW. Forest & Range Exp. Sta., 18 p., illus. (U.S.D.A. Forest Serv. Res. Paper PSW-59)

Schmuths, H., Bachmann, K., Weber, W.E., Horres, R., and Hoffmann, M.H. (2006). Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of Arabidopsis thaliana. Ann. Bot. 97, 623–634. https://doi.org/10.1093/aob/mcl012.

Shaban, M. (2013). Study on some aspects of seed viability and vigor. Int J Adv Biol Biom Res. 2013; 1(12):1692-1697.

Shafii, B., Price, W.J. (2001). Estimation of cardinal temperatures in germination data analysis. JABES *6*, 356–366. doi: 10.1198/108571101317096569.

Sharifiamina, S., Moot, D., And Bloomberg, M. (2016) Calculating "Hydrothermal time" to quantify seed germination of tall fescue. J. New Zeal. Grasslands 78, 163-168.

Shen, J.B., Xu, L.Y., Jin, X.Q., Chen, J.H., and Lu, H.F. (2008). Effect of temperature regime on germination of seed of perennial ryegrass (Lolium perenne). Grass Forage Sci. 63, 249–256.

Shu, K., Meng, Y.J., Shuai, H.W., Liu, W.G., Du, J.B., Liu, J., and Yang, W.Y. (2015). Dormancy and germination: How does the crop seed decide? Plant Biology *17*, 1104–1112. doi:10.1111/plb.12356.

Simmonds, N.W. (1964). The genetics of seed and tuber dormancy in the cultivated potatoes. Heredity 19, 489–504.

Simpson, G.M. (1990). Seed dormancy in grasses (Cambridge ; New York: Cambridge University Press).

Sleper, D.A., West, C.P. (1996). Tall fescue. Cool-Season Forage Grasses 471–502.

Smit, H.J., Metzger, M.J., and Ewert, F. (2008). Spatial distribution of grassland productivity and land use in Europe. Agricultural Systems *98*, 208–219. doi:10.1016/j.agsy.2008.07.004.

Smith KF, Simpson RJ, Culvenor RA, Humphreys MO, Prud'homme MP, Oram RN. (2001). The effects of ploidy and a phenotype conferring a high water-soluble carbohydrate concentration on carbohydrate accumulation, nutritive value and morphology of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). The Journal of Agricultural Science. 136: 65-74.

Soussana, J.-F., and Lüscher, A. (2007). Temperate grasslands and global atmospheric change: a review. Grass and Forage Science *62*, 127–134. doi: 10.1111/j.1365-2494.2007.00577.x.

Steadman KJ. (2004). Dormancy release during hydrated storage in *Lolium rigidum* seeds is dependent on temperature, light quality, and hydration status. Journal of Experimental Botany. 55: 929-937.

Storey, J.D. (2002). A direct approach to false discovery rates. J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol. 64, 479–498. doi: 10.1111/1467-9868.00346.

Storey, J.D., and Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 9440–9445. doi: 10.1073/pnas.1530509100.

Sugimoto, K., Takeuchi, Y., Ebana, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hara, N., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Ban, Y., Hattori, T., et al. (2010). Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. PNAS 107, 5792–5797. https://doi.org/10.1073/pnas.0911965107

Tatipata, A. (2009). Effect of seed moisture content packaging and storage period on mitochondria inner membrane of soybean seed. Journal of Agricultural Technology 5, 51–64.

Thompson, P.A. (1970). Characterization of the Germination Response to Temperature of Species and Ecotypes. Nature 225, 827–831.

Thompson, K., and Ooi, M.K.J. (2010). To germinate or not to germinate: more than just a question of dormancy. Seed Science Research *20*, 209–211. doi:10.1017/S0960258510000267.

Thomson, P.A., 1970. Characterization of the germination response to temperature of species and ecotypes. Nature volume 225, pages 827–831. doi:10.1038/225827a0.

Thorogood, D. (2003). Perennial ryegrass. In: M.D. Casler and R.R. Duncan (eds.) Turfgrass biology, genetics, and breeding. John Wiley and Sons, Hoboken, pp. 75–106.

Tilman, D., Wedin, D., & Knops, J. (1996). Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. Nature, 379(6567), 718-720. https://doi.org/10.1038/379718a0

Torada, A., Koike, M., Ogawa, T., Takenouchi, Y., Tadamura, K., Wu, J., Matsumoto, T., Kawaura, K., and Ogihara, Y. (2016). A Causal Gene for Seed Dormancy on Wheat Chromosome 4A Encodes a MAP Kinase Kinase. Current Biology 26, 782–787. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.063

Turner, N.C., Thomson, C.J., and Rawson, H.M. (2001). Effect of temperature on germination and early growth of subterranean clover, capeweed and Wimmera ryegrass. Grass and Forage Science 56, 97–104. https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2001.00253.x.

Van Treuren, R., de Groot, E.C., and van Hintum, T.J. (2013). Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard genebank conditions. Genetic Resources and Crop Evolution 60, 1407–1421. https://doi.org/10.1007/s10722-012-9929-0.

Van Treuren, R., Bas, N., Kodde, J., Groot, S.P.C., and Kik, C. (2018). Rapid loss of seed viability in ex situ conserved wheat and barley at 4°C as compared to −20°C storage. Conservation Physiology, Volume 6, Issue 1, 2018, coy033, https://doi.org/10.1093/conphys/coy033.

Verdenal A., Combes D., Escobar-Gutiérrez A. (2012). “Programmable and Self-Organised Processes in Plant Morphogenesis: The Architectural Development of Ryegrass”.

Morphogenetic Engineering, Understanding Complex Systems. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-33902-8_19.

Vleeshouwers, L.M., Bouwmeester, H.J., and Karssen, C.M. (1995). Redefining Seed Dormancy: An Attempt to Integrate Physiology and Ecology. The Journal of Ecology *83*, 1031-1037.

Vliegher A, Gils B van, Pol-van Dasselaar A, Hopkins A, Collins R, Fraser M, King V, Lloyd D, Moorby J, Robson P, others. (2014). Roles and utility of grasslands in Europe. EGF at 50: The future of European grasslands. Proceedings of the 25th General Meeting of the European Grassland Federation, Aberystwyth, Wales, 7-11September 2014. IBERS, Aberystwyth University, 753–755.

Walters, C., Wheeler, L.M., and Grotenhuis, J.M. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. Seed Science Research 15, 1–20. doi: 10.1079/SSR2004195.

Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. NATURE, 416(6879), 389-395. https://doi.org/10.1038/416389a.

Weinig, C. (2000). Differing Selection in Alternative Competitive Environments: Shade-Avoidance Responses and Germination Timing. Evolution 54, 124–136.

Weitbrecht, K., Muller, K., and Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. Journal of Experimental Botany *62*, 3289–3309. https://doi.org/10.1093/jxb/err030.

Wheeler, T.R., Craufurd, P.Q., Ellis, R.H., Porter, J.R., and Vara Prasad, P.V. (2000). Temperature variability and the yield of annual crops. Agriculture, Ecosystems & Environment 82, 159–167. doi: 10.1016/S0167-8809(00)00224-3.

Whittington, W.J., Hillman, J., Gatenby, S.M., and Hooper, B.E. (1970). Light and temperature effects on the germination of wild oats. Heredity 25, 641–650.

Xiang, Y., Song, B., Née, G., Kramer, K., Finkemeier, I., and Soppe, W.J.J. (2016). Sequence Polymorphisms at the REDUCED DORMANCY5 Pseudophosphatase Underlie Natural Variation in Arabidopsis Dormancy. Plant Physiology, 171, 2659-2670; doi: 10.1104/pp.16.00525.

Xue, J., Lee, C., Wakeham, S.G., and Armstrong, R.A. (2011). Using principal components analysis (PCA) with cluster analysis to study the organic geochemistry of sinking particles in the ocean. Organic Geochemistry 42, 356–367. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.01.012

Yan, W. , Hunt, L. (1999). An equation for modelling the temperature response of plants using only the cardinal temperatures. *Annals of Botany, 84* (5), 607– 614. doi: 10.1006/anbo.1999.0955

Yamada, T., Forster, J.W., Humphreys, M.W., and Takamizo, T. (2005). Genetics and molecular breeding in *Lolium*/*Festuca* grass species complex. Grassland Science *51*, 89–106. https://doi.org/10.1111/j.1744-697X.2005.00024.x.

Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.G., Kamiya, Y., and Sun, T. (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3β-hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. Plant Cell 10, 2115–2126.

Yamauchi, Y. (2004). Activation of Gibberellin Biosynthesis and Response Pathways by Low Temperature during Imbibition of Arabidopsis thaliana Seeds. Plant cell online 16, 367–378. doi: https://doi.org/10.1105/tpc.018143.

Zaka, S., Ahmed, L., Escobar-Gutiérrez, A., Gastal, F., Julier, B., and Louarn, G. (2017). How variable are non-linear developmental responses to temperature in two perennial forage species? Agricultural and Forest Meteorology, 232, 433-442. http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.10.004.

Zhang, H., McGill, C.R., Irving, L.J., Kemp, P.D., and Zhou, D. (2013). A Modified Thermal Time Model to Predict Germination Rate of Ryegrass and Tall Fescue at Constant Temperatures. Crop Sci. 53, 240-249. doi: 10.2135/cropsci2012.02.0085.

Zhang, H., Tian, Y., and Zhou, D. (2015). A Modified Thermal Time Model Quantifying Germination Response to Temperature for C3 and C4 Species in Temperate Grassland. Agriculture 5, 412–426. doi : 10.3390/agriculture5030412.

Annexes

Annexe 1.1 : Identification des lots de ray-grass anglais (*Lolium perenne L.*) utilisés dans cette investigation.

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
001	SDF1	Variété	2015			
002	SDF2	Variété	2015			
003	SDF3	Variété	2015			
004	SDF4	Variété	2015			
005	SDF5	Variété	2015			
011	DSVLp1	Variété	2015			
012	DSVLp2	Variété	2015			
013	DSVLp3	Variété	2015			
014	DSVLp4	Variété	2015			
015	DSVLp5	Variété	2015			
026	LP TGF 1	Variété	2015			
027	LP TGF 2	Variété	2015			
028	LP TGF 3	Variété	2015			
029	LP TGF 4	Variété	2015			
030	LP TGF 5	Variété	2015			
160	SAGANE	Variété	2015			
161	AGREEMENT	Variété	2015			
162	VERMIO	Variété	2015			
163	VERMILLION	Variété	2015			
164	VERITY	Variété	2015			
165	GR 3122	Sauvage	2003	57.83333	28.41667	Russian Federation
166	GR 3300	Sauvage	2004	50.67806	13.17583	Germany
167	GR 3316	Sauvage	2004	47.85	11.58333	Germany
168	GR 3321	Sauvage	2005	53.46361	11.62972	Germany
169	GR 3327	Sauvage	1995	50.99917	10.90611	Germany
170	GR 3350	Sauvage	2005	53.9975	11.41556	Germany
171	GR 3376	Sauvage	1996	50.13333	19.61667	Poland
172	GR 3244	Sauvage	2004	51.85361	10.67083	Germany
173	GR 3252	Sauvage	2004	51.85	12.17778	Germany
174	GR 3403	Sauvage	1997	53.54528	8.426944	Germany
175	GR 3422	Sauvage	1994	53.61417	7.16	Germany
176	GR 3439	Sauvage	1997	48.01306	10.78611	Germany
177	GR 3469	Sauvage	2002	54.08972	12.585	Germany
178	GR 3477	Sauvage	2004	54.32111	13.53194	Germany
179	GR 3494	Sauvage	1994	48.8	16.65	Czech Republic
180	GR 3511	Sauvage	2005	48.85111	17.12694	Czech Republic
181	GR 3512	Sauvage	2005	49.58333	18.66667	Slovakia
182	GR 3517	Sauvage	2002	49.49778	18.54222	Slovakia
183	GR 3521	Sauvage	2005	51.91361	14.10056	Germany
184	GR 3554	Sauvage	1996	53.83333	8.983333	Germany
185	GR 5028	Sauvage	1995	53.45	12.76667	Germany
186	GR 5029	Sauvage	1997	51.93667	11.98722	Germany
187	GR 5030	Sauvage	1995	50.86944	13.73028	Germany
188	GR 5032	Sauvage	1995	54.53083	13.09139	Germany
189	GR 5035	Sauvage	1995	51.955	10.9675	Germany
190	GR 5036	Sauvage	1995	54.29639	13.68417	Germany
191	GR 5038	Sauvage	1995	50.53861	10.77722	Germany
192	GR 5040	Sauvage	2005	53.8875	10.37833	Germany
193	GR 5041	Sauvage	2005	54.19389	9.094444	Germany
194	GR 5042	Sauvage	2005	47.71972	10.31111	Germany
195	GR 5043	Sauvage	1995	51.62528	6.1975	Germany
196	GR 5044	Sauvage	1995	52.90861	8.587222	Germany
197	GR 5091	Sauvage	1994	53.36556	7.253889	Germany
198	GR 5093	Sauvage	1995	51.15917	9.605278	Germany
199	GR 5102	Sauvage	1994	53.39389	9.1775	Germany
200	GR 5106	Sauvage	1995	48.00556	11.12389	Germany
201	GR 5111	Sauvage	1994	53.31694	7.771944	Germany
202	GR 5410	Sauvage	1998	51.45222	12.93083	Germany

Annexe 1.1. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
203	GR 5565	Sauvage	2005	46.68333	21.5	Romania
204	GR 5435	Sauvage	2002	35.6	52.88333	Iran
205	GR 5559	Sauvage	2001	47.5	22.5	Romania
206	GR 5570	Sauvage	2005	46.91667	23.16667	Romania
207	GR 5579	Sauvage	1998	46.21667	27.85	Romania
208	GR 5587	Sauvage	1998	45.93333	23.33333	Romania
209	GR 5589	Sauvage	1998	47.18333	23.06667	Romania
210	GR 5597	Sauvage	2013	47	22.5	Romania
211	GR 5603	Sauvage	2013	46.3	25.28333	Romania
212	GR 5607	Sauvage	2003	46.73333	22.1	Romania
213	GR 5620	Sauvage	2013	46.16667	23.78333	Romania
214	GR 5623	Sauvage	1998	46.58333	27.36667	Romania
215	GR 5626	Sauvage	2013	46.9	28.06667	Romania
216	GR 5628	Sauvage	2013	47.51667	25.55	Romania
217	GR 5838	Sauvage	1997	52.5	17.5	Poland
218	GR 5841	Sauvage	1997	53.03333	18.45	Poland
219	GR 5847	Sauvage	1997	53.08333	19.38333	Poland
220	GR 5850	Sauvage	1997	53.73333	20.5	Poland
221	GR 5852	Sauvage	1997	53.65	20.76667	Poland
222	GR 5866	Sauvage	1997	53.08333	21.53333	Poland
223	GR 5862	Sauvage	1997	53.41667	21.88333	Poland
224	GR 5868	Sauvage	1997	53.16667	22	Poland
225	GR 5870	Sauvage	1997	52.26667	20.58333	Poland
226	GR 5871	Sauvage	1997	52.3	18.34056	Poland
227	GR 6021	Sauvage	2008	52.68639	11.42444	Germany
228	GR 6031	Sauvage	2008	52.43806	11.96111	Germany
229	GR 6303	Sauvage	2002	44.71667	15.35	Croatia (Hrvatska)
230	GR 6306	Sauvage	2003	45.11667	14.6	Croatia (Hrvatska)
231	GR 6307	Sauvage	2001	45.48333	15.71667	Croatia (Hrvatska)
232	GR 6309	Sauvage	2002	45.45	14.95	Croatia (Hrvatska)
233	GR 6394	Sauvage	2009	46.06667	16.16667	Croatia (Hrvatska)
234	GR 6335	Sauvage	2002	44.91667	15.15	Croatia (Hrvatska)
235	GR 6339	Sauvage	2002	45.23333	15.05	Croatia (Hrvatska)
236	GR 6342	Sauvage	2003	45.41667	15.41667	Croatia (Hrvatska)
237	GR 6346	Sauvage	2002	45.05	15.1	Croatia (Hrvatska)
238	GR 6349	Sauvage	2002	44.71667	15.36667	Croatia (Hrvatska)
239	GR 6383	Sauvage	1999	45.13333	18.93333	Croatia (Hrvatska)
240	GR 6384	Sauvage	1999	45.15	18.7	Croatia (Hrvatska)
241	GR 6385	Sauvage	1999	45.48333	18.08333	Croatia (Hrvatska)
242	GR 6389	Sauvage	1999	45.31667	17.66667	Croatia (Hrvatska)
243	GR 6391	Sauvage	1999	45.35	16.7	Croatia (Hrvatska)
244	GR 6568	Sauvage	2000	42.31972	25.95639	Bulgaria
245	GR 6569	Sauvage	2000	42.64889	26.85806	Bulgaria
246	GR 6578	Sauvage	2000	42.1825	27.8425	Bulgaria
247	GR 6585	Sauvage	2000	42.98889	27.855	Bulgaria
248	GR 6587	Sauvage	2000	43.40583	28.07222	Bulgaria
249	GR 6590	Sauvage	2000	43.38278	26.68611	Bulgaria
250	GR 6595	Sauvage	2000	43.54917	25.67389	Bulgaria
251	GR 6598	Sauvage	2003	43.52278	24.81306	Bulgaria
252	GR 6562	Sauvage	2000	41.59111	24.38472	Bulgaria
253	GR 8486	Sauvage	2010	(41)	(29)	Turquie
254	GR 8494	Sauvage	2011			Turquie
255	GR 8504	Sauvage	2011			Grèce
256	GR 8524	Sauvage	2011			Grèce
257	GR 8543	Sauvage	2012	(39.92077)	(32.85411)	Turquie
258	GR 8531	Sauvage	2011	(38)	(35)	Turquie
259	GR 8545	Sauvage	2012			GRC
260	GR 12014	Sauvage	2006	53.09889	-7.79806	Ireland
261	GR 12038	Sauvage	2005	53.34889	-6.31778	Ireland

Annexe 1.1. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
262	GR 12041	Sauvage	2005	53.27111	-6.49778	Ireland
263	GR 12049	Sauvage	2005	52.59583	-9.22667	Ireland
264	GR 12050	Sauvage	2005	52.02222	-9.52278	Ireland
265	GR 12051	Sauvage	2005	51.93139	-10.2653	Ireland
266	GR 12652	Sauvage	2010	48.78083	13.80389	Germany
267	GR 12053	Sauvage	2005	51.75194	-9.45639	Ireland
268	GR 12054	Sauvage	2005	51.57611	-9.23444	Ireland
269	GR 12499	Sauvage	2010	49.39333	12.32306	Germany
270	GR 6600	Sauvage	2000	42.30944	24.74611	Bulgaria
271	GR 6608	Sauvage	2000	42.30833	23.00417	Bulgaria
272	GR 6720	Sauvage	2003	41.88417	23.35194	Bulgaria
273	GR 6724	Sauvage	2003	41.83417	23.48278	Bulgaria
274	GR 6876	Sauvage	2001	42.38583	-7.17417	Spain
275	GR 6882	Sauvage	2003	42.27611	-7.65111	Spain
276	GR 6889	Sauvage	2003	42.55222	-9.02306	Spain
277	GR 6911	Sauvage	2001	43.61472	-7.30861	Spain
278	GR 6972	Sauvage	2003	42.31806	23.75194	Bulgaria
279	GR 6990	Sauvage	2003	43.06778	-8.17889	Spain
280	GR 6991	Sauvage	2000	43.34583	-7.45417	Spain
281	GR 7004	Sauvage	2004	42.81667	-8.18333	Spain
282	GR 7149	Sauvage	2005	42.29333	23.25222	Bulgaria
283	GR 7393	Sauvage	2002	43.225	-8.965	Spain
284	GR 7617	Sauvage	2010	51.32528	9.916389	Germany
285	GR 7619	Sauvage	2008	51.10417	9.471944	Germany
286	GR 7638	Sauvage	2010	50.10556	8.3975	Germany
307	RGT-LPE1	Variété	2015			
308	RGT-LPE2	Variété	2015			
309	RGT-LPE3	Variété	2015			
310	RGT-LPE4	Variété	2015			
311	RGT-LPE5	Variété	2015			
335	DYLAN	Variété	2015			
336	DOUBLE	Variété	2015			
337	GREENWAY	Variété	2015			
338	ALLSTARTER	Variété	2015			
339	CHARBIN	Variété	2015			
408	2690??B1	Sauvage	Inconnu	43.57152	1.787844	France
409	2690??B2	Sauvage	Inconnu	43.57152	1.787844	France
410	2691??B1	Sauvage	Inconnu	43.335	1.624	France
411	269312B1	Sauvage	2012	42.92707	0.873241	France
412	269388B1	Sauvage	1988	42.92707	0.873241	France
413	2695??B1	Sauvage	Inconnu	43.02877	1.690891	France
414	269693B1	Sauvage	1993	42.87528	1.762254	France
415	2697??B1	Sauvage	Inconnu	42.60427	1.842671	France
416	2699??B1	Sauvage	Inconnu	42.76784	2.118014	France
417	270088B3	Sauvage	1988	42.81278	2.029035	France
418	2700??B1	Sauvage	Inconnu	42.81278	2.029035	France
419	2702??B1	Sauvage	Inconnu	42.90337	2.091133	France
420	270288B2	Sauvage	19??	42.90337	2.091133	France
421	270314B1	Sauvage	2014	42.67791	2.278165	France
422	270388B1	Sauvage	1988	42.67791	2.278165	France
423	2708??B1	Sauvage	Inconnu	42.97551	2.02879	France
424	271414B1	Sauvage	2014	44.32	5.325	France
425	271493B1	Sauvage	1993	44.32	5.325	France
426	271593B1	Sauvage	1993	44.4405	4.836114	France
427	2716??B1	Sauvage	Inconnu	44.54854	4.720334	France
428	2716??B2	Sauvage	Inconnu	44.54854	4.720334	France
429	271793B1	Sauvage	1993	44.66678	4.915787	France
430	271793B2	Sauvage	1993	44.66678	4.915787	France
431	271893B1	Sauvage	1993	44.8389	5.013338	France

Annexe 1.1. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
432	271893B2	Sauvage	1993	44.8389	5.013338	France
433	2721??B1	Sauvage	Inconnu	45.1473	5.297415	France
434	2721??B2	Sauvage	Inconnu	45.1473	5.297415	France
435	2730??B1	Sauvage	Inconnu	45.54675	5.741458	France
436	273289B1	Sauvage	1989	45.83618	5.794341	France
437	274293B1	Sauvage	1993	45.54832	6.13278	France
438	274313B1	Sauvage	2013	45.33061	5.937463	France
439	274389B1	Sauvage	1989	45.33061	5.937463	France
440	274711B1	Sauvage	2011	48.87062	-1.34154	France
441	274790B1	Sauvage	1990	48.87062	-1.34154	France
442	274811B1	Sauvage	2011	49.23191	-1.47557	France
443	274888B1	Sauvage	1988	49.23191	-1.47557	France
444	274914B1	Sauvage	2014	49.18739	-1.11995	France
445	274990B1	Sauvage	1990	49.18739	-1.11995	France
446	275114B1	Sauvage	2014	48.60197	-0.09657	France
447	275190B1	Sauvage	1990	48.60197	-0.09657	France
448	275314B1	Sauvage	2014	48.51082	-0.45196	France
449	275390B1	Sauvage	1990	48.51082	-0.45196	France
450	275411B1	Sauvage	2011	48.73669	-0.49685	France
451	275490B1	Sauvage	1990	48.73669	-0.49685	France
452	275513B1	Sauvage	2013	48.9633	-0.18617	France
453	275588B1	Sauvage	1988	48.9633	-0.18617	France
454	275612B1	Sauvage	2012	49.05277	-0.63079	France
455	275688B1	Sauvage	1988	49.05277	-0.63079	France
456	276292B1	Sauvage	1992	48.96481	0.480532	France
457	276292B2	Sauvage	1992	48.96481	0.480532	France
458	276690B1	Sauvage	1990	47.74636	1.194006	France
459	276990B1	Sauvage	1990	47.11554	1.906351	France
460	278390B1	Sauvage	1990	47.20569	1.817279	France
461	278690B1	Sauvage	1990	49.55227	0.479379	France
462	279391B1	Sauvage	1991	47.69993	0.705166	France
463	279391B2	Sauvage	1991	47.69993	0.705166	France
464	279790B1	Sauvage	1990	44.83912	0.082608	France
465	280188B1	Sauvage	1988	45.96644	0.818485	France
466	280495B1	Sauvage	1995	46.14843	0.190601	France
467	283491B1	Sauvage	1991	47.38284	3.612956	France
468	283911B1	Sauvage	2011	46.48541	2.787631	France
469	283990B1	Sauvage	1990	46.48541	2.787631	France
470	284491B1	Sauvage	1991	43.58306	-0.84328	France
471	284612B1	Sauvage	2012	43.31112	-1.18059	France
472	284688B1	Sauvage	1988	43.31112	-1.18059	France
473	285114B1	Sauvage	2014	43.21	-0.361	France
474	285214B1	Sauvage	2014	43.38546	-0.23857	France
475	285413B1	Sauvage	2013	43.91947	0.000556	France
476	285495B1	Sauvage	1995	43.91947	0.000556	France
477	285590B1	Sauvage	1990	43.63114	0.418801	France
478	285714B1	Sauvage	2014	42.92521	0.135473	France
479	285793B1	Sauvage	1993	42.92521	0.135473	France
480	286290B1	Sauvage	1990	43.33213	0.15262	France
481	286795B1	Sauvage	1995	46.63746	4.983679	France
482	286889B1	Sauvage	1989	45.6613	4.976433	France
483	286995B1	Sauvage	1995	45.54231	4.576455	France
484	287095B1	Sauvage	1995	45.63222	4.442913	France
485	287291B1	Sauvage	1991	45.28974	4.719149	France
486	287313B1	Sauvage	2013	45.19899	4.621474	France
487	287414B1	Sauvage	2014	45.1537	4.594877	France
488	287513B1	Sauvage	2013	45.08103	4.49718	France
489	287593B1	Sauvage	1993	45.08103	4.49718	France
490	287695B1	Sauvage	1995	44.94541	4.488497	France

Annexe 1.1. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
491	287993B1	Sauvage	1993	44.41969	4.089193	France
492	287993B2	Sauvage	1993	44.41969	4.089193	France
493	288195B1	Sauvage	1995	44.40042	3.751339	France
494	288213B1	Sauvage	2013	44.34561	3.582494	France
495	288395B1	Sauvage	1995	44.65261	3.475299	France
496	288895B1	Sauvage	1995	44.25265	2.800237	France
497	289693B1	Sauvage	1993	48.2717	-3.4486	France
498	289712B1	Sauvage	2012	47.41082	-1.83026	France
499	290193B1	Sauvage	1993	47.6087	-2.44656	France
500	290693B1	Sauvage	1993	47.92328	-2.43739	France
501	290713B1	Sauvage	2013	47.91968	-2.4276	France
502	291093B1	Sauvage	1993	48.55331	-3.79397	France
503	291193B1	Sauvage	1993	48.45985	-4.11553	France
504	291593B1	Sauvage	1993	48.17972	-4.02521	France
505	292093B2	Sauvage	1993	49.98341	2.896737	France
506	292093B1	Sauvage	1993	49.98341	2.896737	France
507	292790B1	Sauvage	1990	50.33226	1.606846	France
508	293193B2	Sauvage	1993	50.84754	1.676906	France
509	293193B1	Sauvage	1993	50.84754	1.676906	France
510	293391B1	Sauvage	1991	50.85749	2.023636	France
511	293693B2	Sauvage	1993	50.77778	2.610618	France
512	293693B1	Sauvage	1993	50.77778	2.610618	France
513	293889B1	Sauvage	1989	50.47331	3.535979	France
514	294493B1	Sauvage	1993	49.2305	1.902407	France
515	294693B1	Sauvage	1993	49.38593	2.542253	France
516	294793B1	Sauvage	1993	48.1726	1.735505	France
517	295591B1	Sauvage	1991	43.33943	2.766118	France
518	295693B1	Sauvage	1993	43.4208	2.765987	France
519	296491B1	Sauvage	1991	43.72597	4.730522	France
520	297094B1	Sauvage	1994	44.04887	4.036427	France
521	298213B1	Sauvage	2013	48.07204	4.305307	France
522	298288B1	Sauvage	1988	48.07204	4.305307	France
523	298412B1	Sauvage	2012	48.20552	3.682609	France
524	298488B1	Sauvage	1988	48.20552	3.682609	France
525	298814B1	Sauvage	2014	47.88561	2.527301	France
526	298888B1	Sauvage	1988	47.88561	2.527301	France
527	299014B1	Sauvage	2014	47.279	4.228	France
528	299093B1	Sauvage	1993	47.279	4.228	France
529	299212B1	Sauvage	2012	47.17214	5.374079	France
530	299288B1	Sauvage	1988	47.17214	5.374079	France
531	299612B1	Sauvage	2012	48.38431	3.05985	France
532	299688B1	Sauvage	1988	48.38431	3.05985	France
533	300814B1	Sauvage	2014	47.80508	5.461904	France
534	300895B2	Sauvage	1995	47.80508	5.461904	France
535	301089B1	Sauvage	1989	47.62554	5.773509	France
536	301214B1	Sauvage	2014	47.685	6.5	France
537	301292B1	Sauvage	1992	47.685	6.5	France
538	301489B1	Sauvage	1989	47.53963	6.885503	France
539	301593B1	Sauvage	1993	47.81035	6.79608	France
540	302092B1	Sauvage	1992	48.12341	5.994984	France
541	302193B1	Sauvage	1993	48.34796	5.638809	France
542	302712B1	Sauvage	2012	48.65477	2.837072	France
543	302788B1	Sauvage	1988	48.65477	2.837072	France
544	302914B1	Sauvage	2014	48.42991	3.193139	France
545	302994B1	Sauvage	1994	48.42991	3.193139	France
546	303814B1	Sauvage	2014	48.6108	3.237266	France
547	303091B1	Sauvage	1991	48.88179	3.1923	France
548	303213B1	Sauvage	2013	48.88179	3.1923	France
549	303288B1	Sauvage	1988	48.97188	3.103203	France

Annexe 1.1. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
550	303391B2	Sauvage	1991	48.97188	3.103203	France
551	303391B1	Sauvage	1991	49.42956	4.880824	France
552	303794B1	Sauvage	1994	49.25	4.033	France
553	303891B1	Sauvage	1991	49.25	4.033	France
554	304193B2	Sauvage	1993	49.24368	3.324988	France
555	304313B1	Sauvage	2013	49.6053	3.368742	France
556	304394B1	Sauvage	1994	49.6053	3.368742	France
557	304713B1	Sauvage	2013	49.69822	4.168866	France
558	304788B1	Sauvage	1988	49.69822	4.168866	France
559	305390B1	Sauvage	1990	48.84699	6.171556	France
560	305493B1	Sauvage	1993	48.43985	6.038878	France
561	306292B1	Sauvage	1992	48.76265	7.639511	France
562	306392B1	Sauvage	1992	49.03408	7.727985	France
563	306495B1	Sauvage	1995	49.03294	7.461082	France
564	307814B1	Sauvage	2014	46.02439	-0.71406	France
565	308395B1	Sauvage	1995	44.65875	0.994918	France
566	308614B1	Sauvage	2014	45.36375	1.927157	France
567	308688B1	Sauvage	1988	45.36375	1.927157	France
568	308995B2	Sauvage	1995	45.18283	0.887372	France
569	309988B2	Sauvage	1988	43.85039	1.289568	France
570	311093B1	Sauvage	1993	43.90813	2.489609	France
571	311391B1	Sauvage	1991	43.95154	1.89391	France
572	313292B1	Sauvage	1992	47.96813	-0.61982	France
573	313512B1	Sauvage	2012	47.98381	-1.89978	France
574	313593B1	Sauvage	1993	47.98381	-1.89978	France
575	313611B1	Sauvage	2011	48.04703	-1.93546	France
576	313693B1	Sauvage	1993	48.04703	-1.93546	France
577	314793B1	Sauvage	1993	46.2132	5.126703	France
578	315793B1	Sauvage	1993	46.77479	5.4548	France
579	316190B1	Sauvage	1990	47.26333	5.58737	France
580	316493B1	Sauvage	1993	47.37467	6.325391	France
581	316590B1	Sauvage	1990	47.30235	6.316629	France
582	316614B1	Sauvage	2014	47.04081	6.450499	France
583	316690B1	Sauvage	1990	47.04081	6.450499	France
584	317693B1	Sauvage	1993	48.5615	-2.40751	France
585	319812B1	Sauvage	2012	44.96706	4.223475	France
586	319888B1	Sauvage	1988	44.96706	4.223475	France
587	320214B1	Sauvage	2014	45.29691	2.849218	France
588	320995B1	Sauvage	1995	43.45351	6.643039	France
589	321093B1	Sauvage	1993	43.60827	6.891848	France
590	321992B1	Sauvage	1992	43.76628	5.788724	France
591	322292B1	Sauvage	1992	43.76995	6.660341	France
592	322492B1	Sauvage	1992	44.22953	6.330542	France
593	322992B1	Sauvage	1992	44.66976	5.680602	France
594	323292B1	Sauvage	1992	44.69934	6.28533	France
595	327205B1	Sauvage	2005	50.84	4.35	France
596	330005B1	Sauvage	2005	41.91	8.73	France
597	331605B1	Sauvage	2005	55.67	12.56	France
598	335605B1	Sauvage	2005	37.98	23.71	France
599	336205B1	Sauvage	2005	47.5	19.04	France
600	337005B1	Sauvage	2005	53.34	-6.27	France
601	345205B1	Sauvage	2005	44.43	26.1	France
602	349805B1	Sauvage	2005	50.45	30.52	France
603	JDRAX 116	Variété	2015			
604	RH3112	Variété	2015			
605	RA1690	Variété	2015			
606	RA3005	Variété	2015			
607	R5848	Variété	2015			
608	R2873	Variété	2015			

Annexe 1.1. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
609	LPMA	Variété	2015			
610	RA1787	Variété	2015			
611	RH1784	Variété	2015			
612	RH3122	Variété	2015			
613	RA1692	Variété	2015			
614	RH3126	Variété	2015			
615	RH3117	Variété	2015			
616	RH3114	Variété	2015			
617	RH1785	Variété	2015			
618	RH4220	Variété	2015			
619	PXNZ	Variété	2015			
620	RA3008	Variété	2015			
621	RA1687	Variété	2015			
622	RA1786	Variété	2015			
623	21027	Variété	2015			
624	4182	Variété	2015			
625	ALLSTARTER	Variété	2015			
626	DOUBLE	Variété	2015			
627	FABIAN	Variété	2015			
628	TETRASTAR	Variété	2015			

Annexe 1.2 : Identification des lots de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb) utilisés dans cette investigation.

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
006	SDF 6	Variété				
007	SDF 7	Variété				
008	SDF 8	Variété				
009	SDF 9	Variété				
010	SDF 10	Variété				
016	DSVFa1	Variété				
017	DSVFa2	Variété				
018	DSVFa3	Variété				
019	DSVFa4	Variété				
020	DSVFa5	Variété				
021	FA TGF 1	Variété				
022	FA TGF 2	Variété				
023	FA TGF 3	Variété				
024	FA TGF 4	Variété				
025	FA TGF 5	Variété				
031	495114B1	Sauvage	2014	39.36	-9.15	Portugal
032	495014B1	Sauvage	2014	36.86	6.1	Algérie
033	489614B1	Sauvage	2014	46.38333333	5.866666667	France
034	499688B1	Sauvage	1988	35.41	9.33	Tunisie
035	499788B1	Sauvage	1988	36.81	10.16	Tunisie
036	495194B1	Sauvage	1994	39.36	-9.15	Portugal
037	500694B1	Sauvage	1994	39.74	-8.82	Portugal
038	499488B1	Sauvage	1988	35.86	9.2	Tunisie
039	499088B1	Sauvage	1988	33.17	-5.87	Maroc
040	500388B1	Sauvage	1988	35.68	10.1	Tunisie
041	495793B1	Sauvage	1993	41.16	-7.79	Portugal
042	495214B1	Sauvage	2014	39.55	-8.98	Portugal
043	495493B1	Sauvage	1993	39.23	-9.08	France
044	495414B1	Sauvage	2014	39.23	-9.08	France
045	500988B1	Sauvage	1988	36.7	9.3	Tunisie
046	500588B1	Sauvage	1988	35.9	8.9	Tunisie
047	495593B1	Sauvage	1993	36.77	5.04	Algérie
048	496193B1	Sauvage	1993	32.94	-5.66	Maroc
049	496093B1	Sauvage	1993	36.8	6.92	Algérie
050	495993B1	Sauvage	1993	32.94	-5.66	Maroc
051	495894B2	Sauvage	1994	40.42	-8.73	Portugal
052	495793B2	Sauvage	1993	41.16	-7.79	Portugal
053	495693B2	Sauvage	1993	39.145029	-9.23212	Portugal
054	495993B2	Sauvage	1993	32.94	-5.66	Maroc
055	502013B1	Sauvage	2013	32.94	-5.66	Maroc
056	496193B2	Sauvage	1993	32.94	-5.66	Maroc
057	496288B2	Sauvage	1988	33.4	-5.3	Maroc
058	496388B2	Sauvage	1988	33.93	-5.21	Maroc

Annexe 1.2. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
059	496488B2	Sauvage	1988	33.2	-5.54	Maroc
060	496093B2	Sauvage	1993	36.8	6.92	Algérie
061	496588B2	Sauvage	1988	34.04	-4.87	Maroc
062	496688B2	Sauvage	1988	33.75	-6.18	Maroc
063	496788B2	Sauvage	1988	33.16	-5.56	Maroc
064	496893B2	Sauvage	1993	36.78	8.2	Algérie
065	497088B2	Sauvage	1988	33.68	-5.36	Maroc
066	496988B2	Sauvage	1988	33.75	-6.19	Maroc
067	496812B1	Sauvage	2012	36.78	8.2	Algérie
068	497188B2	Sauvage	1988	33.75	-6.22	Maroc
069	497288B2	Sauvage	1988	33.42	-5.25	Maroc
070	497388B2	Sauvage	1988	33.8	-5.43	Maroc
071	497488B2	Sauvage	1988	33.77	-5.41	Maroc
072	497588B2	Sauvage	1988	36.6	10.5	Tunisie
073	497688B2	Sauvage	1988	34.03	-5.56	Maroc
074	497793B2	Sauvage	1993	36.26	2.75	Algérie
075	497893B2	Sauvage	1993	35.24	0.15	Algérie
076	497988B2	Sauvage	1988	34.76	-5.97	Maroc
077	498088B2	Sauvage	1988	36.81	10.16	Tunisie
078	498188B2	Sauvage	1988	36.08	8.95	Tunisie
079	498293B2	Sauvage	1993	36.62	5.33	Algérie
080	498388B2	Sauvage	1988	35.63	9.67	Tunisie
081	498488B2	Sauvage	1988	34.09	-5.55	Maroc
082	498588B2	Sauvage	1988	36.03	9.69	Tunisie
083	498688B2	Sauvage	1988	33.4	-5.32	Maroc
084	498788B2	Sauvage	1988	36.81	10.16	Tunisie
085	498888B2	Sauvage	1988	33.18	-5.88	Maroc
086	498988B2	Sauvage	1988	36.23	10.17	Tunisie
087	499188B2	Sauvage	1988	35.74	9.59	Tunisie
088	499288B2	Sauvage	1988	36.81	10.16	Tunisie
089	499388B2	Sauvage	1988	36.22	10.17	Tunisie
090	499588B2	Sauvage	1988	33.98	-5.24	Maroc
091	499888B2	Sauvage	1988	36.67	10.83	Tunisie
092	499988B1	Sauvage	1988	37.15	9.16	Tunisie
093	500088B2	Sauvage	1988	33.07	-5.76	Maroc
094	500288B2	Sauvage	1988	35.85	9.59	Tunisie
095	502093B2	Sauvage	1993	32.94	-5.66	Maroc
096	500488B2	Sauvage	1988	35.25	9.4	Tunisie
097	500788B2	Sauvage	1988	36.81	10.16	Tunisie
098	500893B2	Sauvage	1993	40.26	-8.8	Portugal
099	501088B2	Sauvage	1988	36.81	10.16	Tunisie
100	501188B2	Sauvage	1988	36.4	10.14	Tunisie
101	489690B2	Sauvage	1990	46.38333333	5.866666667	France

Annexe 1.2. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
102	489788B2	Sauvage	1988	45.32	2.766666667	France
103	489890B2	Sauvage	1990	46.4	0.733333333	France
104	489990B2	Sauvage	1990	45.75	3.2	France
105	490090B2	Sauvage	1990	44.26666667	1.13	France
106	490190B2	Sauvage	1990	44.21	0.97	France
107	490290B2	Sauvage	1990	44.5	0.966666667	France
108	490390B2	Sauvage	1990	44.75	0.07	France
109	490490B2	Sauvage	1990	43.75	1.433333333	France
110	490590B2	Sauvage	1990	43.7	1.816666667	France
111	490688B2	Sauvage	1988	43.36666667	2.283333333	France
112	490790B2	Sauvage	1990	43.48333333	2.35	France
113	490890B2	Sauvage	1990	43.73333333	3.316666667	France
114	490988B2	Sauvage	1988	46.11	7.5	France
115	491090B2	Sauvage	1990	45.85	5.783333333	France
116	491190B2	Sauvage	1990	45.99	5.69	France
117	491290B2	Sauvage	1990	44.36666667	5.14	France
118	491390B2	Sauvage	1990	44.43333333	5.716666667	France
119	491490B2	Sauvage	1990	44.4	5.5	France
120	491590B2	Sauvage	1990	44.53333333	5.816666667	France
121	491690B2	Sauvage	1990	44.41666667	6	France
122	491790B2	Sauvage	1990	44.2	5.933333333	France
123	491890B2	Sauvage	1990	44.4	6.166666667	France
124	491990B2	Sauvage	1990	44	6.216666667	France
125	492190B2	Sauvage	1990	43.7	6.333333333	France
126	492090B2	Sauvage	1990	43.98333333	6.2	France
127	492290B2	Sauvage	1990	43.78333333	6.333333333	France
128	492891B2	Sauvage	1991	43.41666667	5.216666667	France
129	492688B2	Sauvage	1988	43.43	-0.84	France
130	492991B2	Sauvage	1991	43.58333333	5	France
131	492591B2	Sauvage	1991	44.36666667	4.65	France
132	493191B2	Sauvage	1991	43.61666667	4.466666667	France
133	493292B2	Sauvage	1992	46.07	4.9	France
134	493392B2	Sauvage	1992	46.2	5.216666667	France
135	493492B2	Sauvage	1992	46.38333333	5.566666667	France
136	501913B1	Sauvage	2013	36.22	7.95	Algérie
137	493592B2	Sauvage	1992	46.9	5.766666667	France
138	501294B2	Sauvage	1994	39.24	-9.31	Portugal
139	494092B2	Sauvage	1992	45.9	5.35	France
140	494192B2	Sauvage	1992	45.35	5.95	France
141	495093B2	Sauvage	1993	36.86	6.1	Algérie
142	494393B2	Sauvage	1993	46.46666667	6.06	France
143	494292B2	Sauvage	1992	45.86666667	5.7	France
144	494492B2	Sauvage	1992	46.56666667	6.416666667	Suisse
145	494593B2	Sauvage	1993	46.8	6.75	Suisse

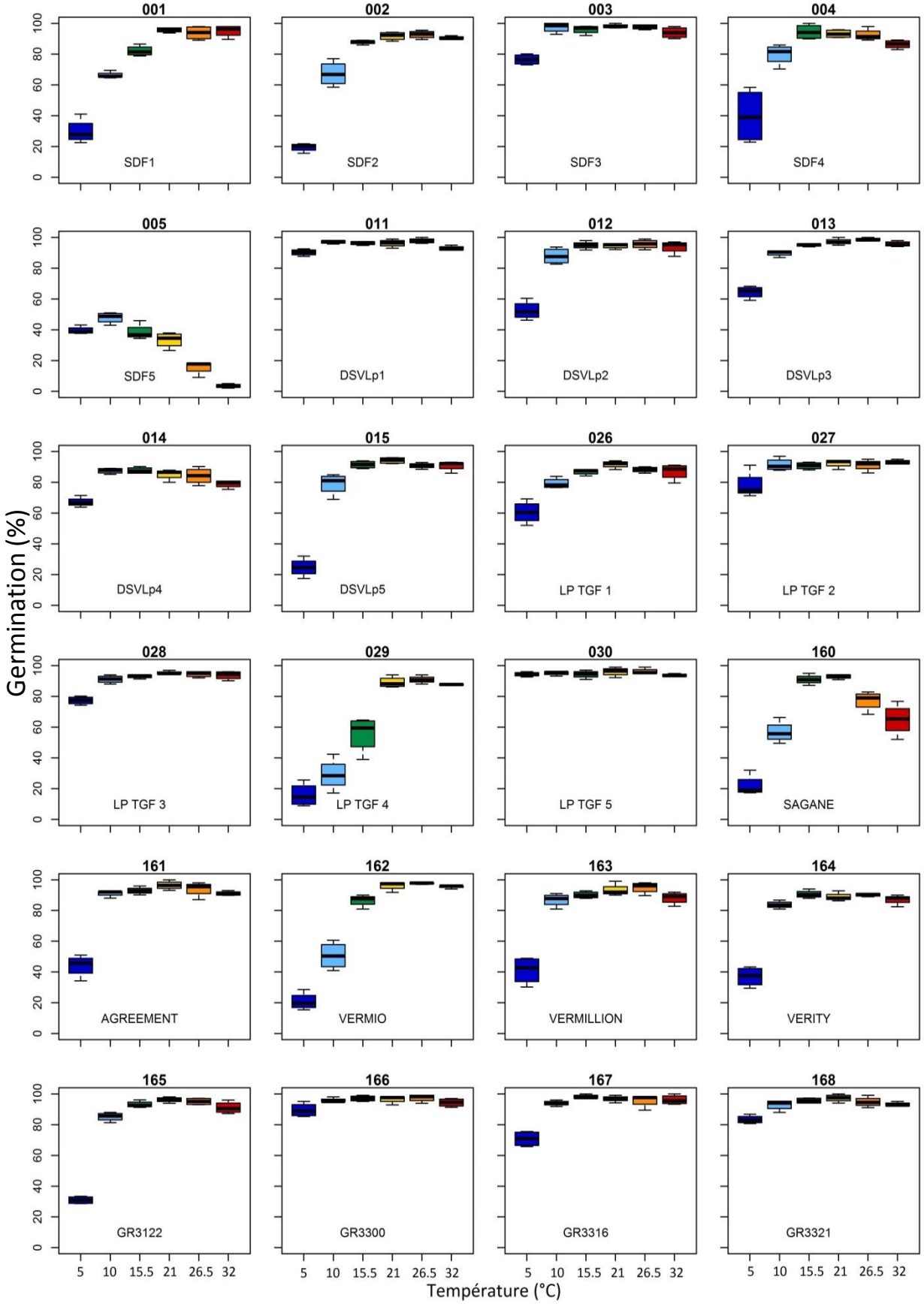
Annexe 1.2. Suite

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
146	494690B2	Sauvage	1990	44.5	0.166666667	France
147	494792B2	Sauvage	1992	45.83333333	4.616666667	France
148	494893B2	Sauvage	1993	46.06	5.6	France
149	495294B2	Sauvage	1994	39.55	-8.98	Portugal
150	494993B2	Sauvage	1993	41.28	-7.16	Portugal
151	495393B2	Sauvage	1993	36.666394	5.16015	Algérie
152	495493B2	Sauvage	1993	39.23	-9.08	France
153	495593B2	Sauvage	1993	36.77	5.04	Algérie
154	493793B2	Sauvage	1993	47.1	5.883333333	France
155	VERDORM	Variété				
156	VERDARK	Variété				
157	DIVYNA	Variété				
158	AGILE	Variété				
159	NORIA	Variété				
295	14007 i	Variété				
296	14008 i	Variété				
297	14009 i	Variété				
298	15002 i	Variété				
302	RGT-FAR1	Variété				
303	RGT-FAR2	Variété				
304	RGT-FAR3	Variété				
305	RGT-FAR4	Variété				
306	RGT-FAR5	Variété				
330	EYECANDY	Variété				
331	ESSENTIAL	Variété				
332	GRAWDE	Variété				
333	SENCICIA	Variété				
334	GREENFRONT	Variété				

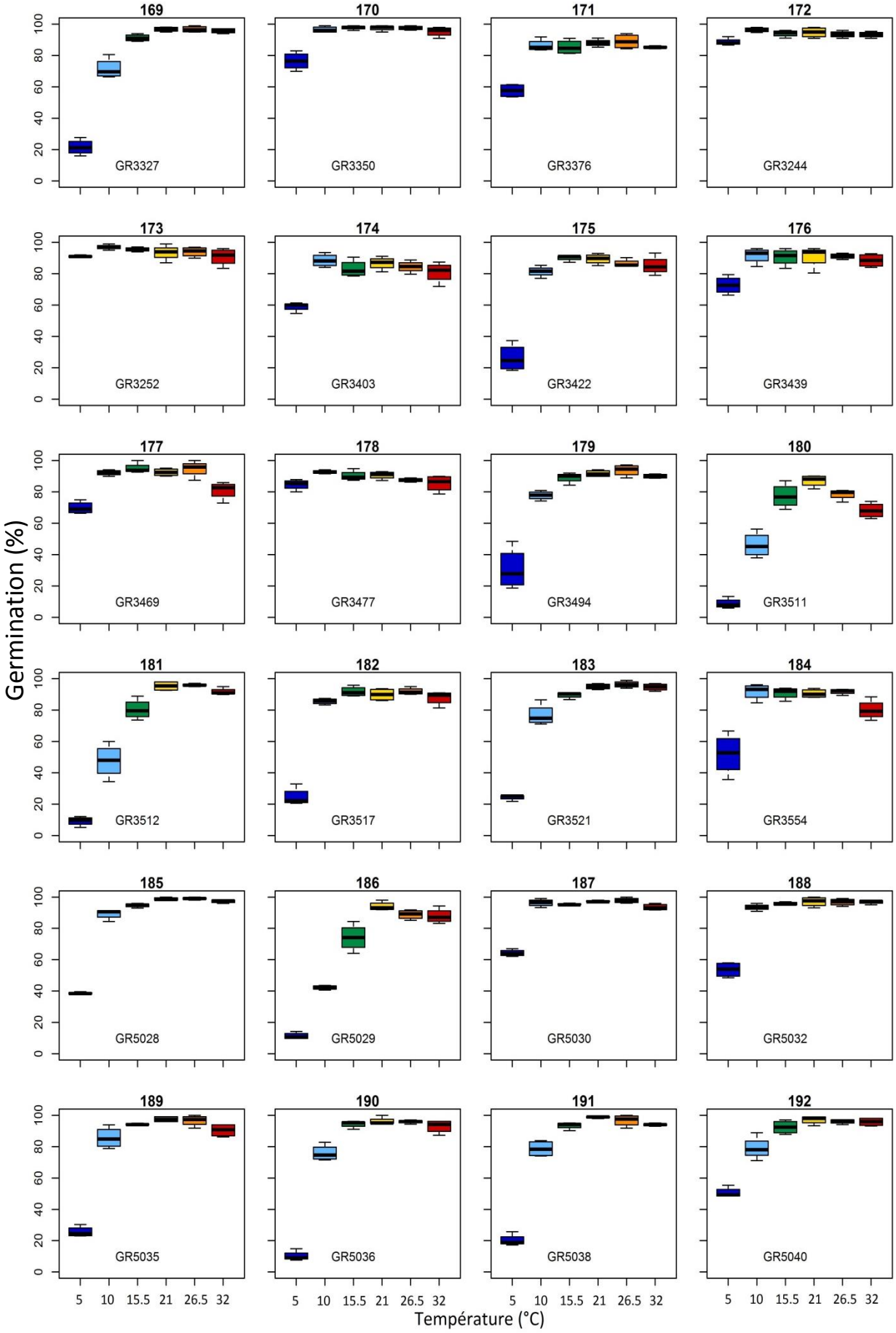
Annexe 1.3 : Identification des lots de ray-grass anglais (*Dactylis glomerata* L.) utilisés dans cette investigation.

ID manip	Accession	Biological Status	Année de récolte	Latitude	Longitude	Nom du site
287	NGB 2 163,1	Variété				
288	NGB 2 735,1	Variété				
289	NGB 5 075,1	Variété				
290	NGB 15 465,2	Variété				
292	MEDLY	Variété				
293	PORTO	Variété				
294	UPL	Variété				
299	071715B1	Sauvage	2014	47.62	-3.08	France
300	051188B2	Sauvage	1988	48.17	-2.57	France
301	077888B1	Sauvage	1988	48.62	-1.5	France

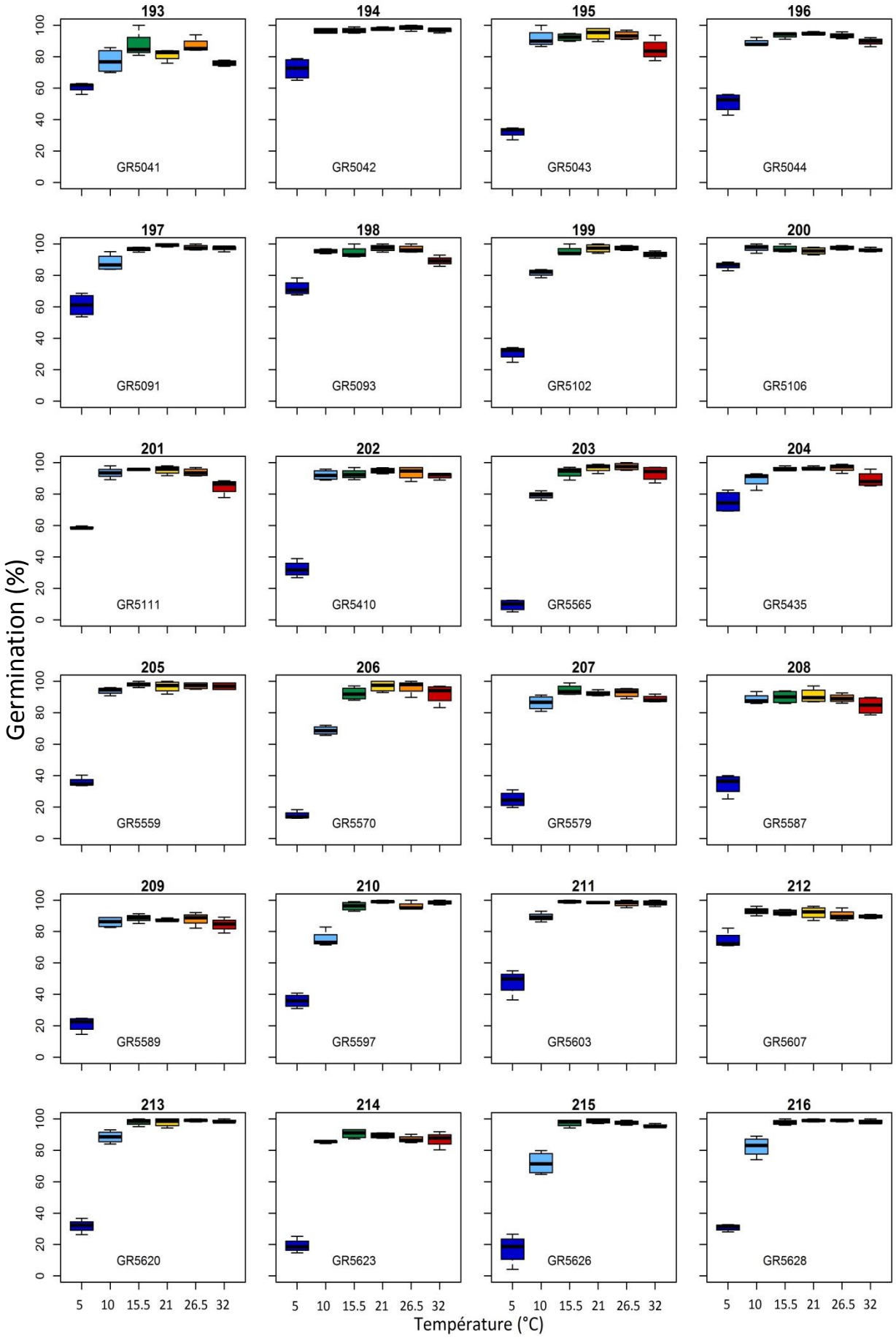
Annexe 2.1 : Boîtes à moustaches de chaque lot de graines de ray-grass, faits sur le pourcentage de germination observés à six température (5; 10; 15,5; 2; 26,5 et 32 °C).



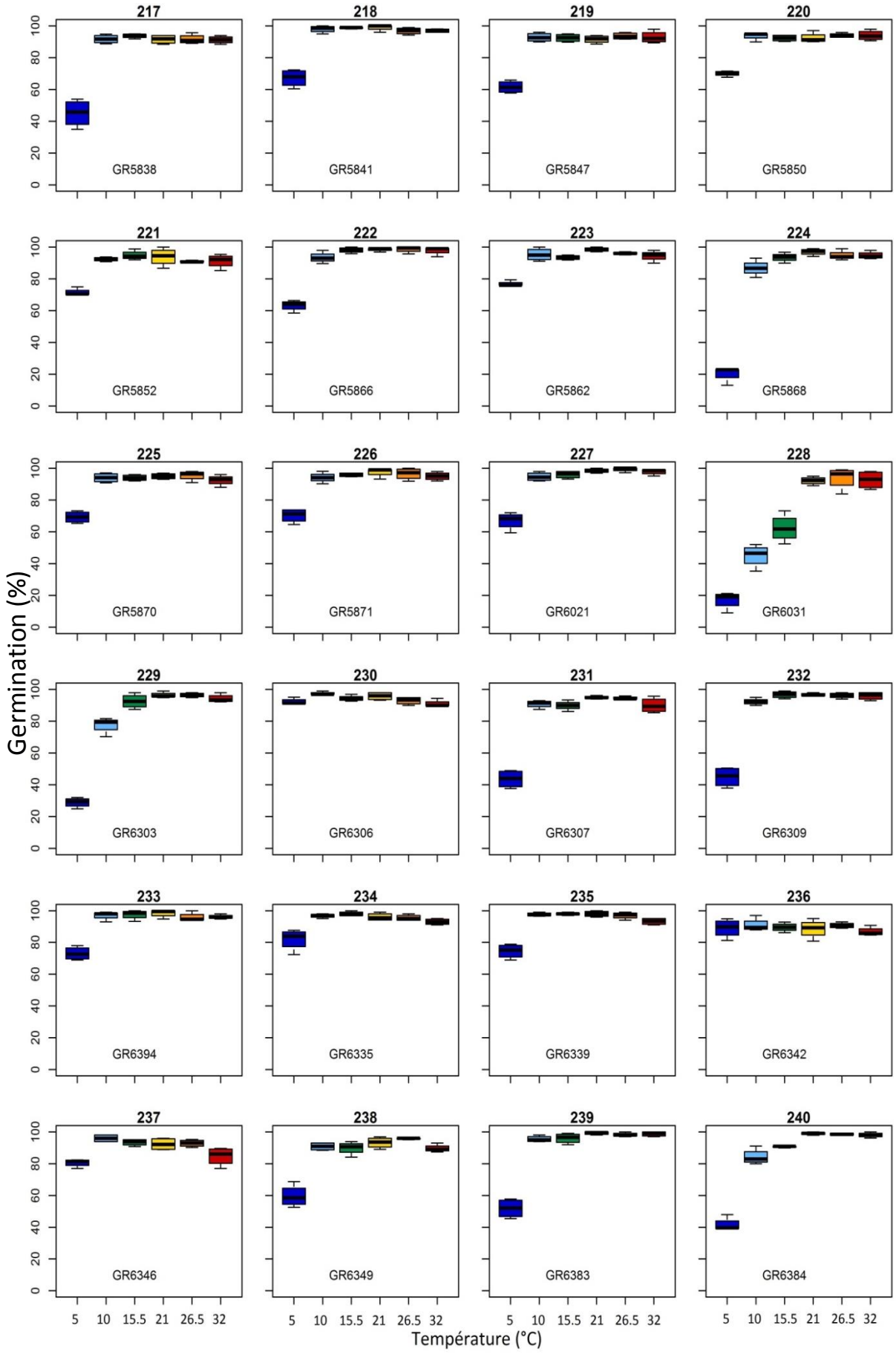
Annexe 2.1. Suite



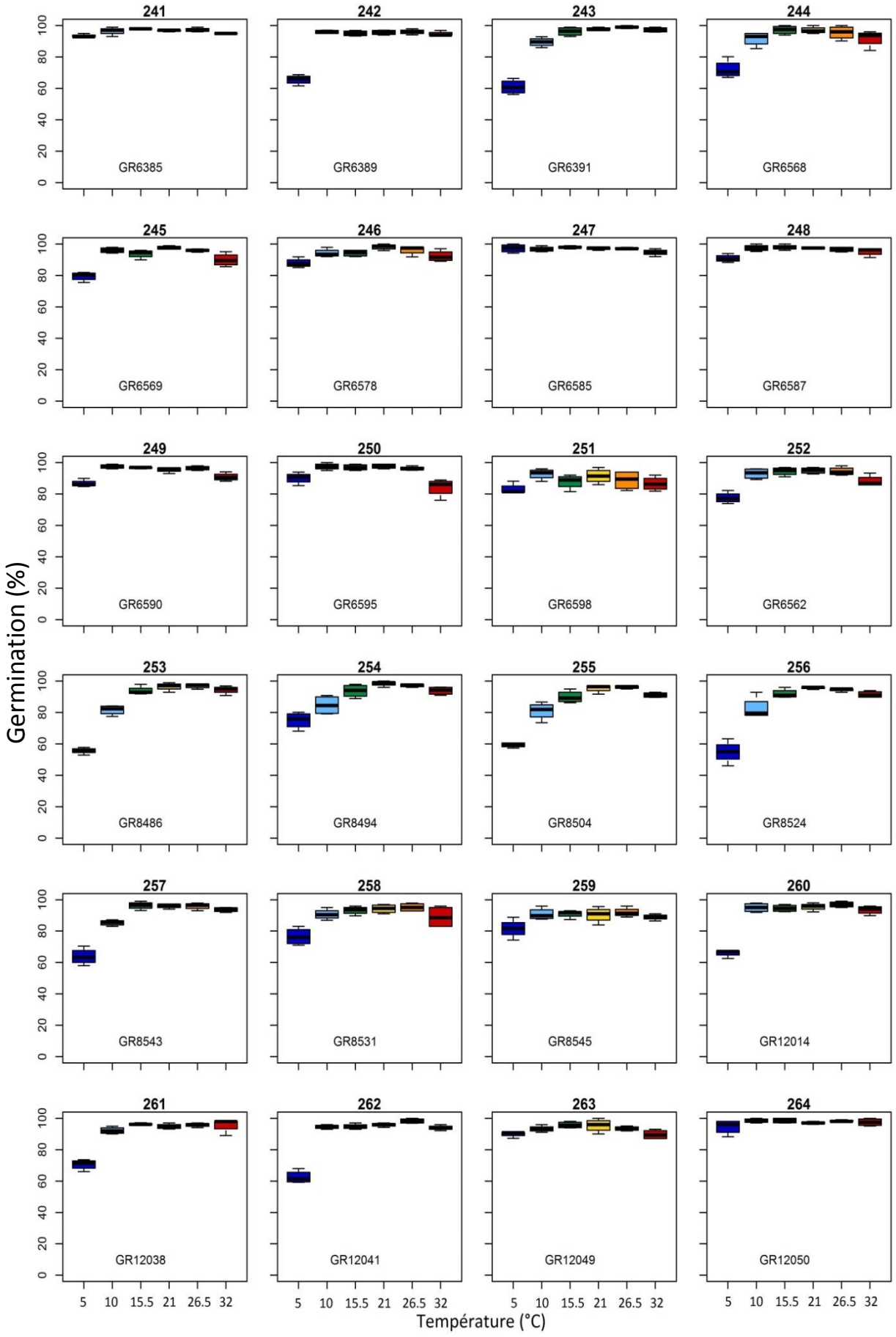
Annexe 2.1. Suite



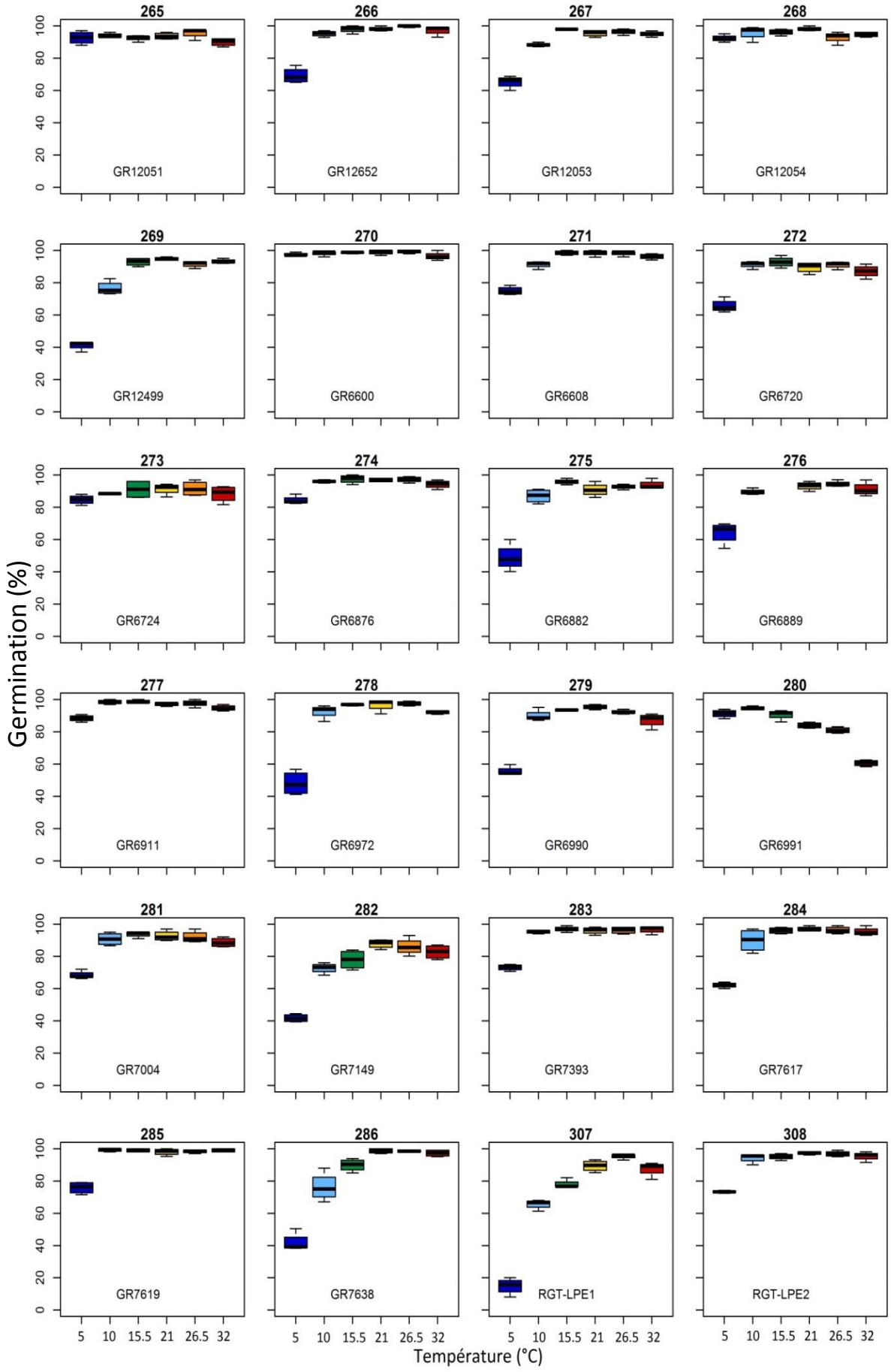
Annexe 2.1. Suite



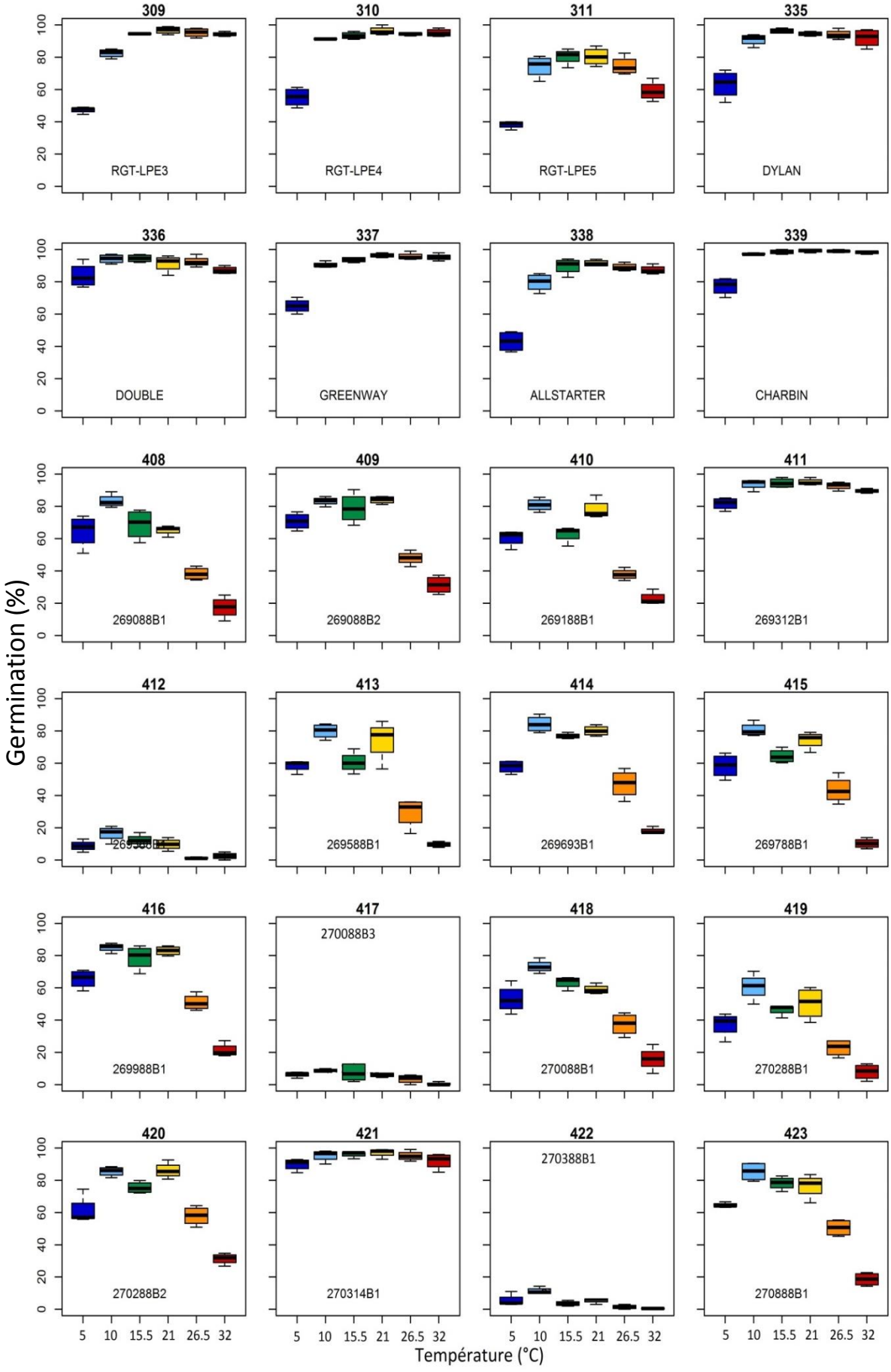
Annexe 2.1. Suite



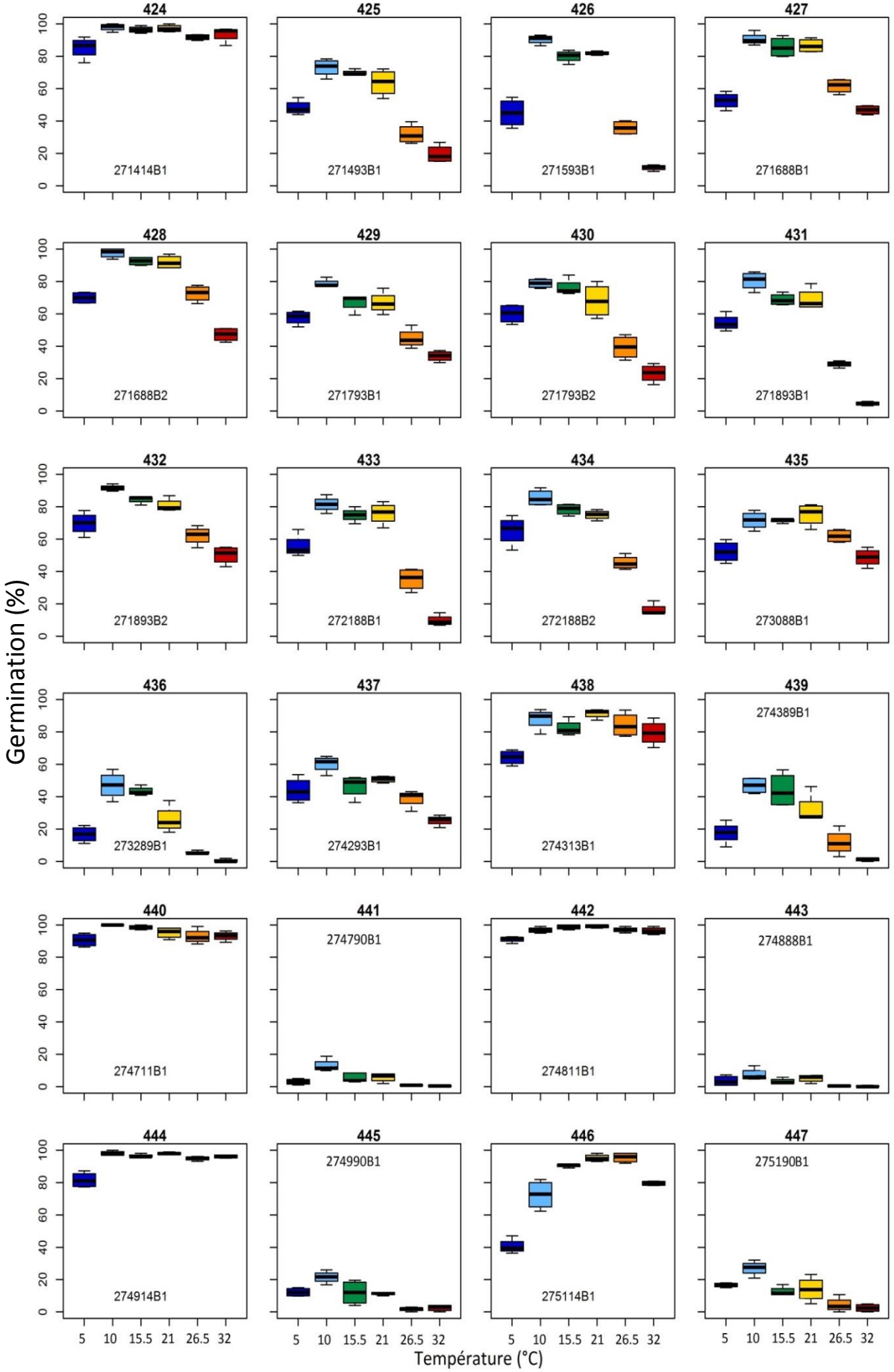
Annexe 2.1. Suite



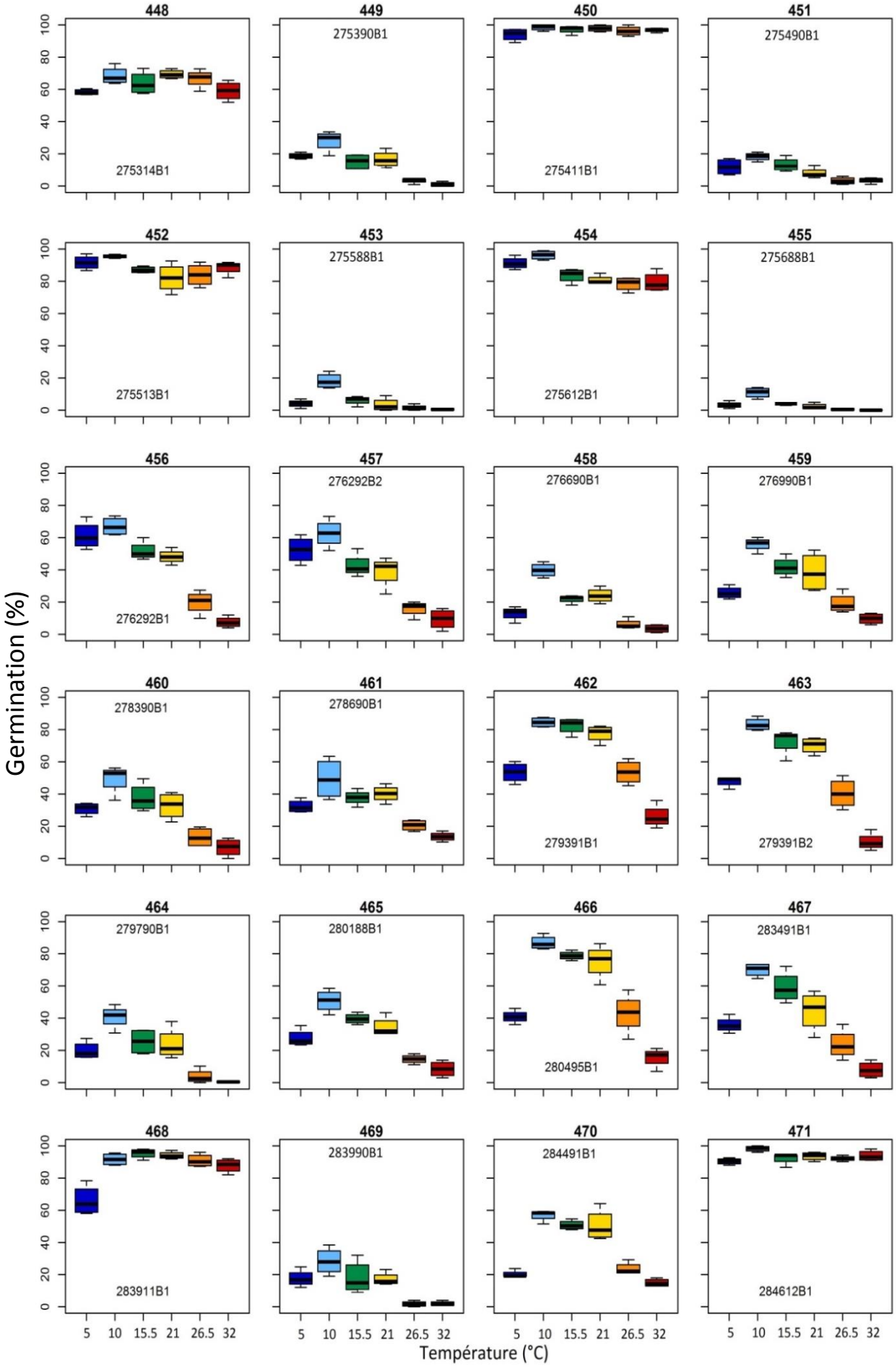
Annexe 2.1. Suite



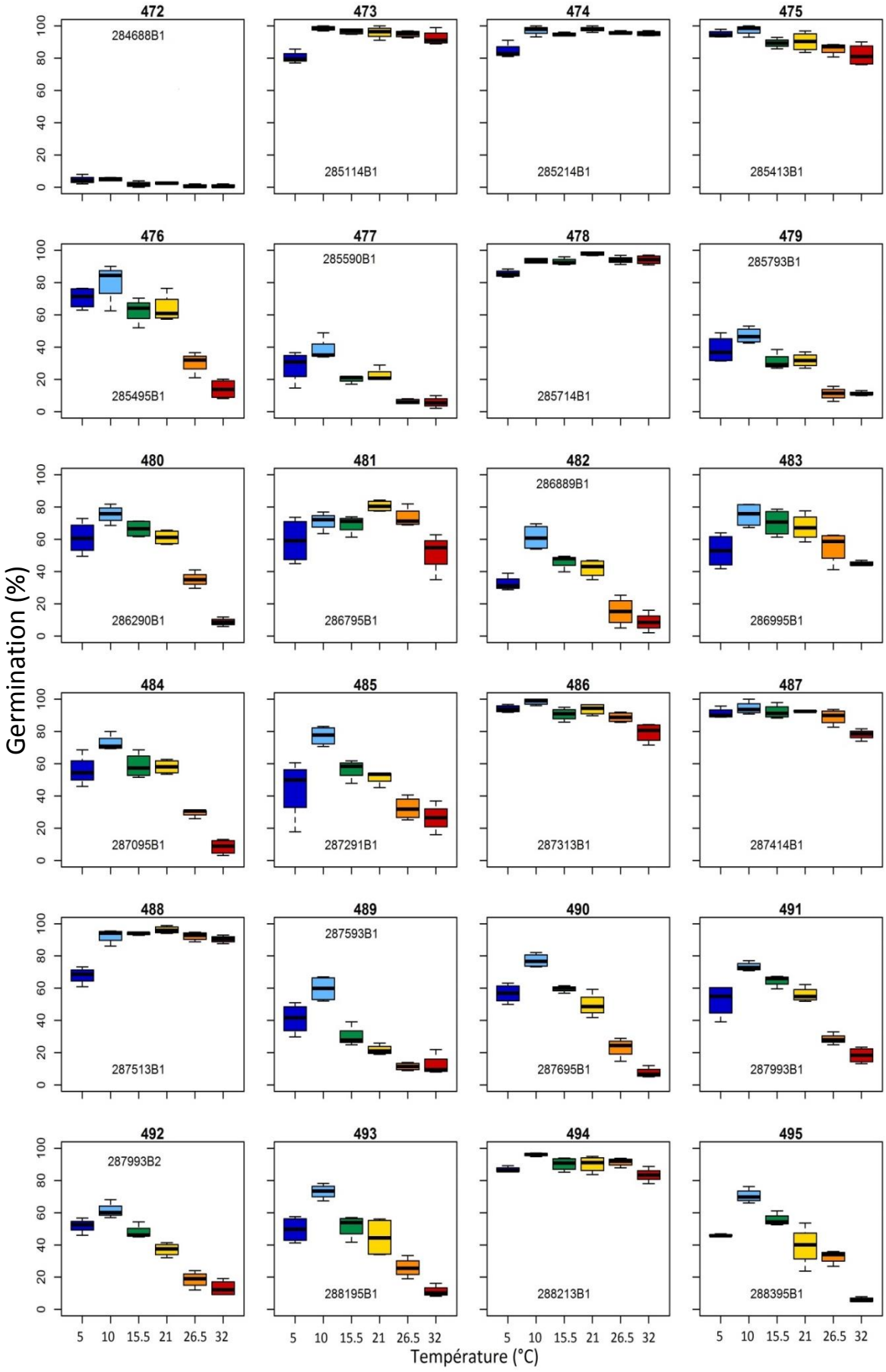
Annexe 2.1. Suite



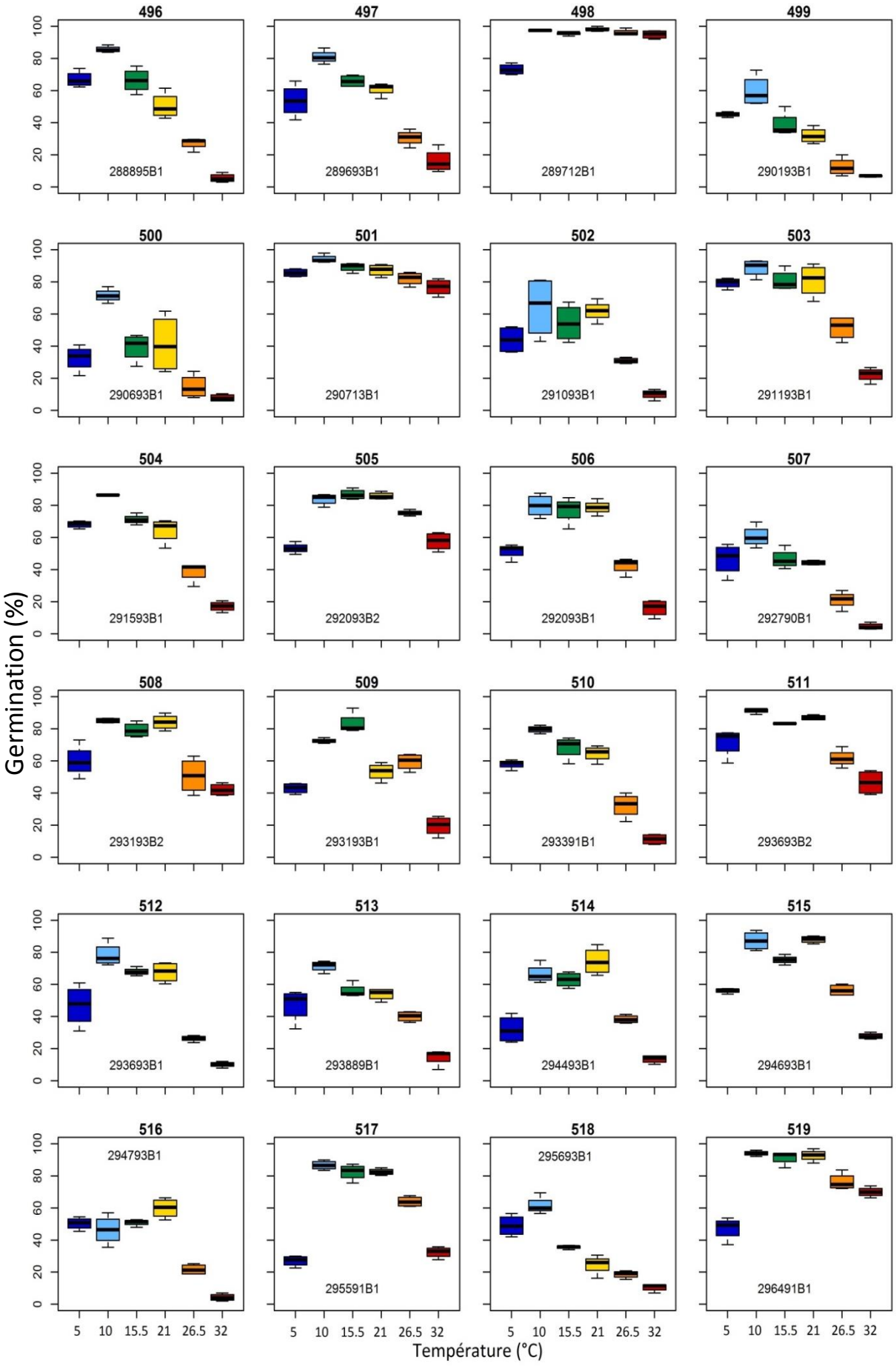
Annexe 2.1. Suite



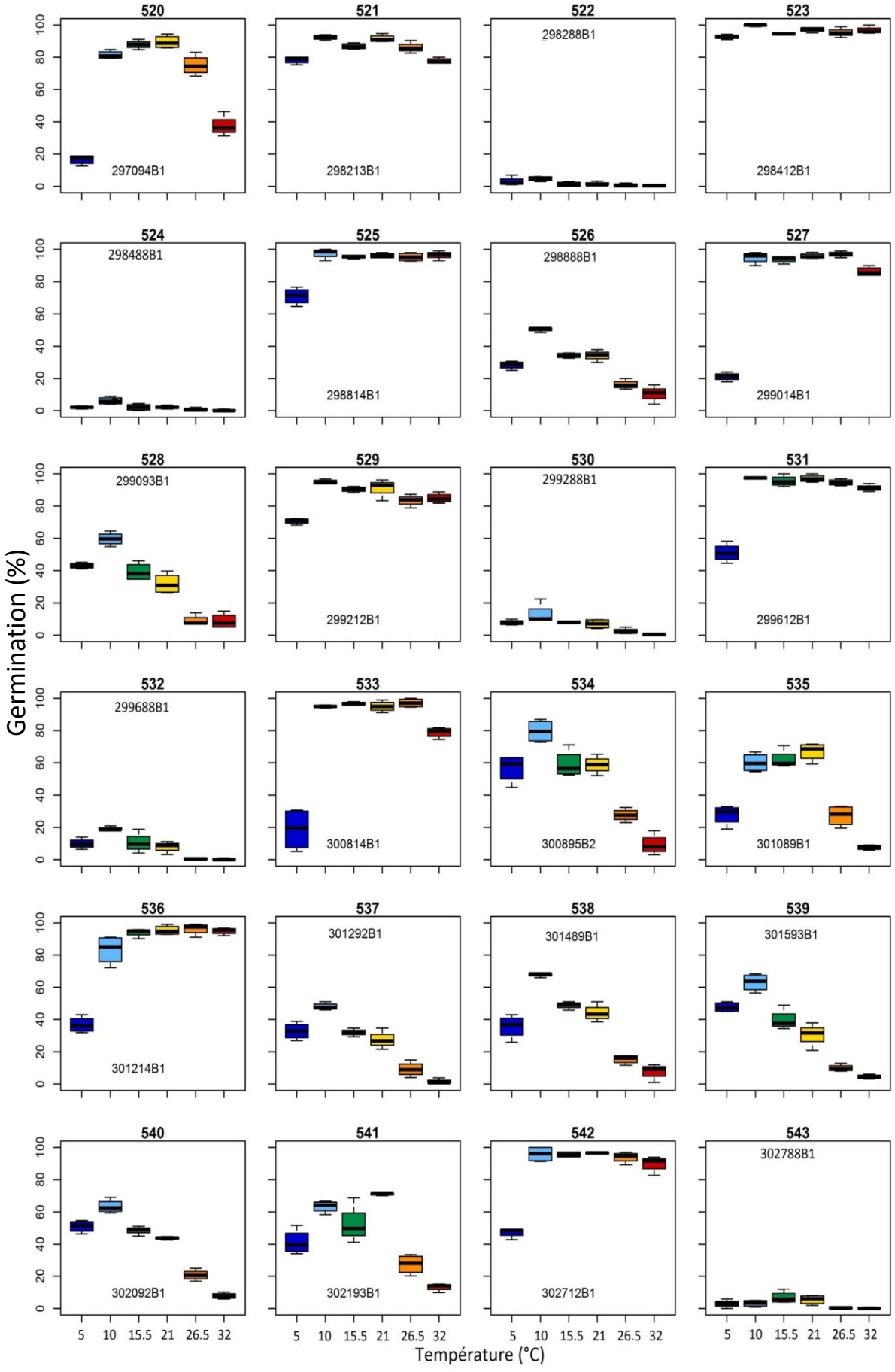
Annexe 2.1. Suite



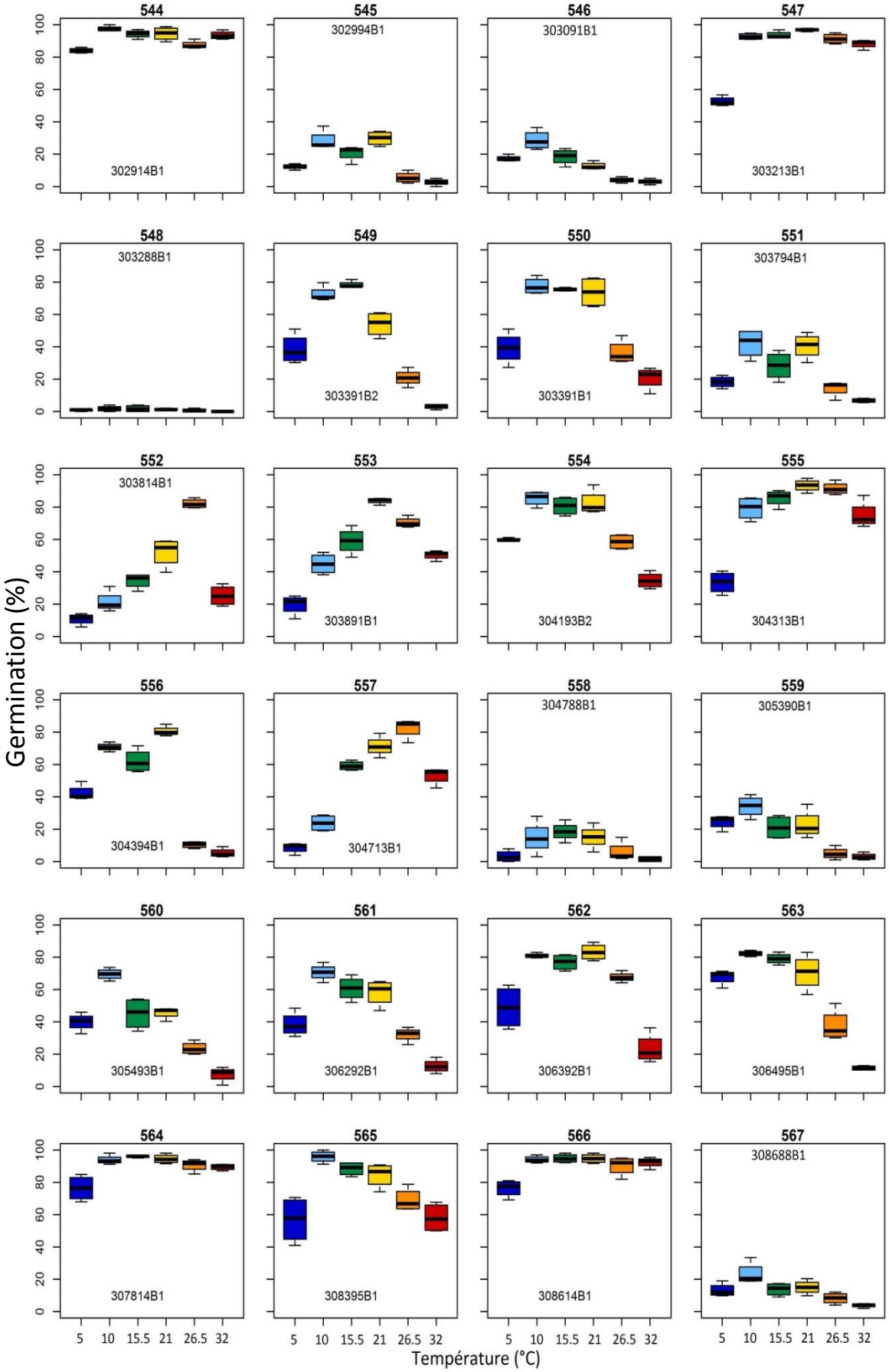
Annexe 2.1. Suite



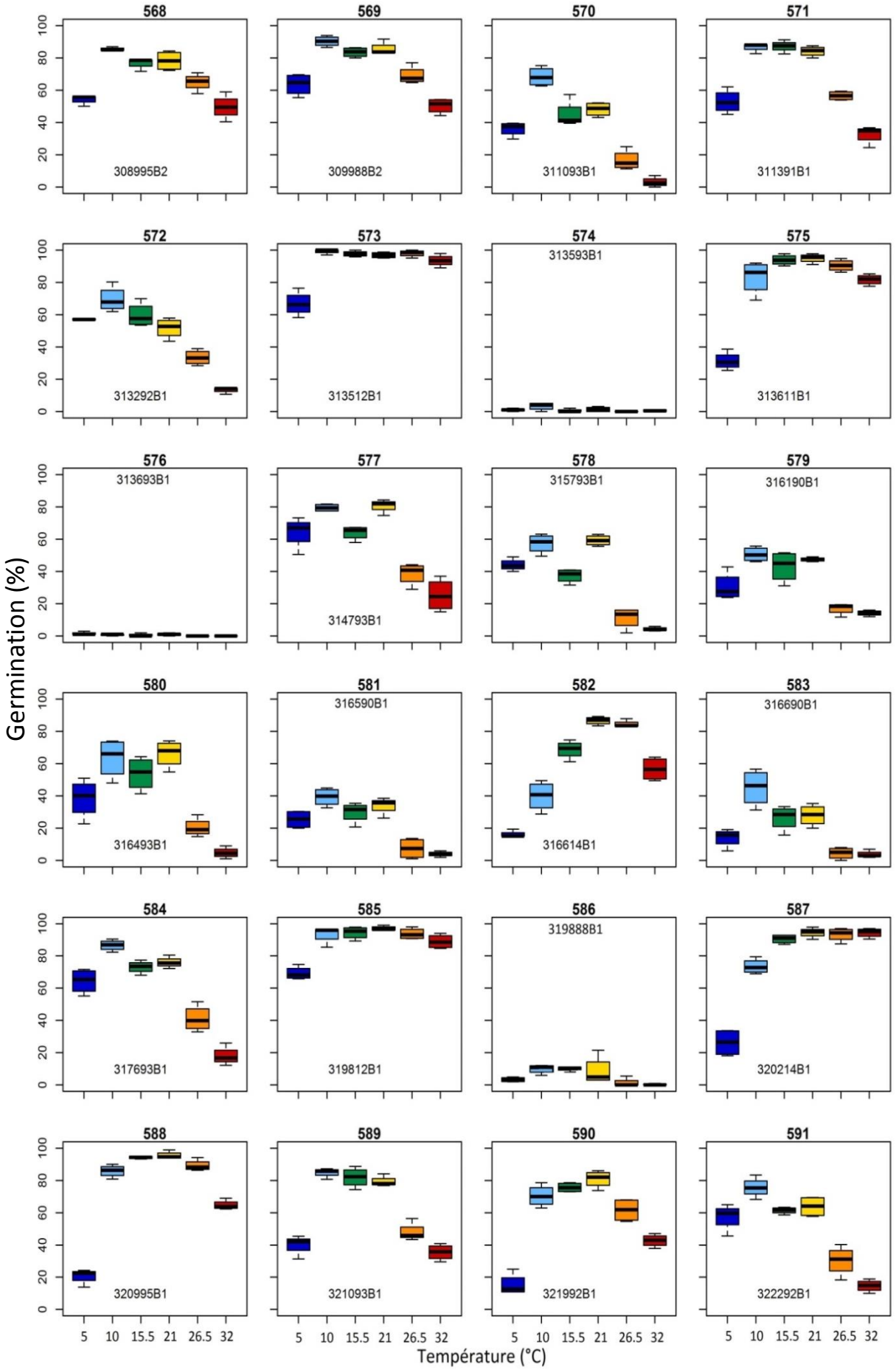
Annexe 2.1. Suite



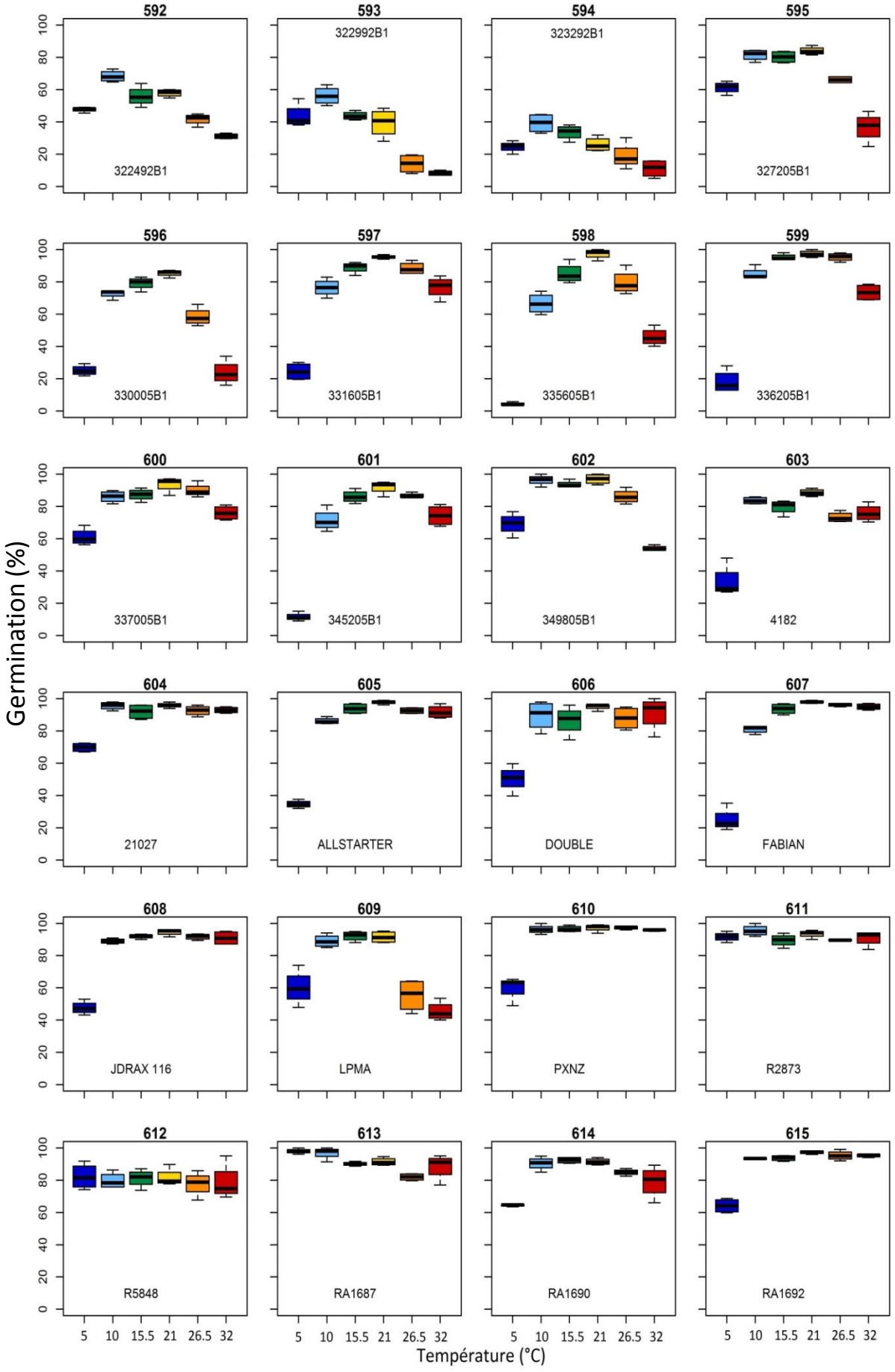
Annexe 2.1. Suite



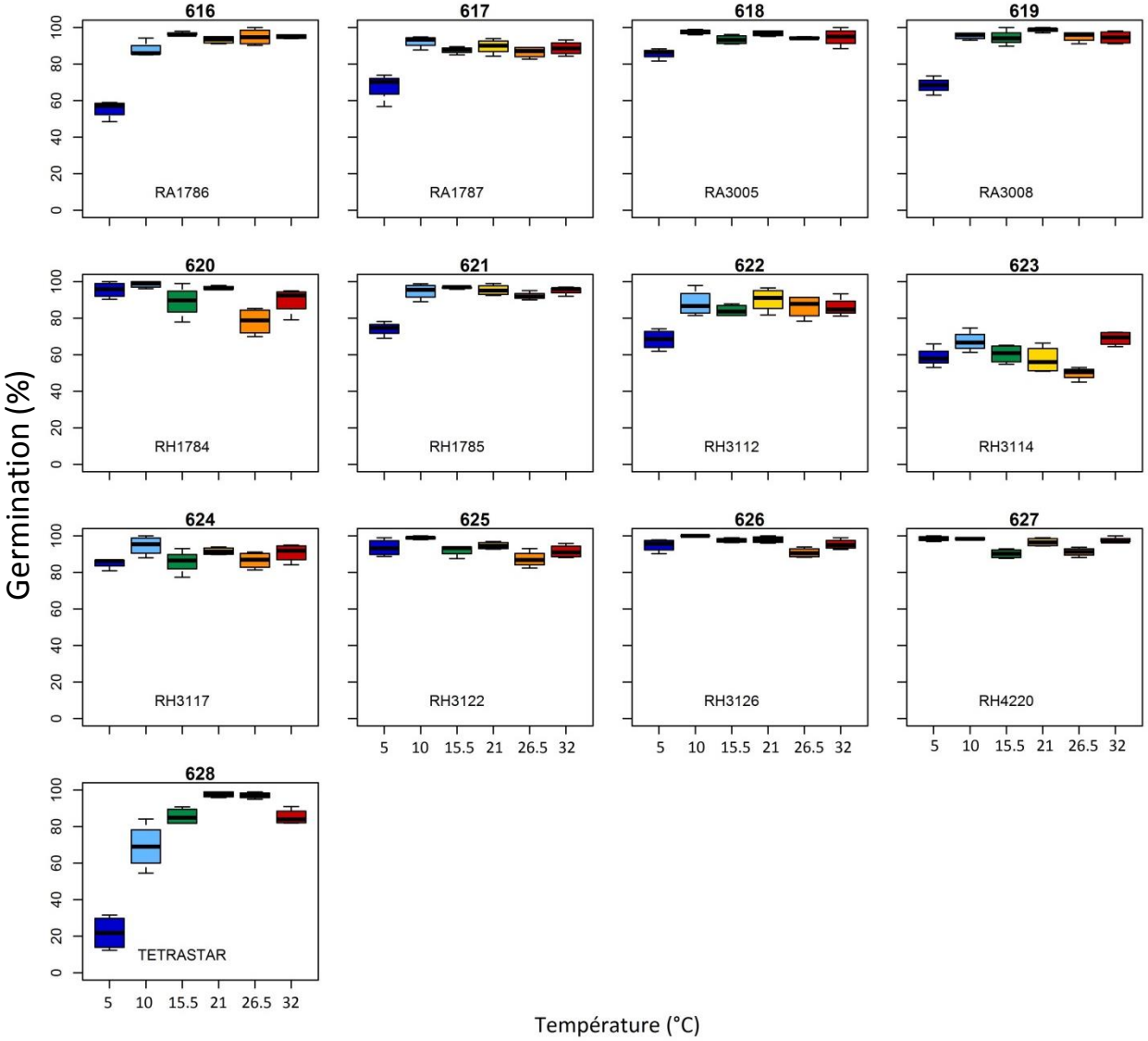
Annexe 2.1. Suite



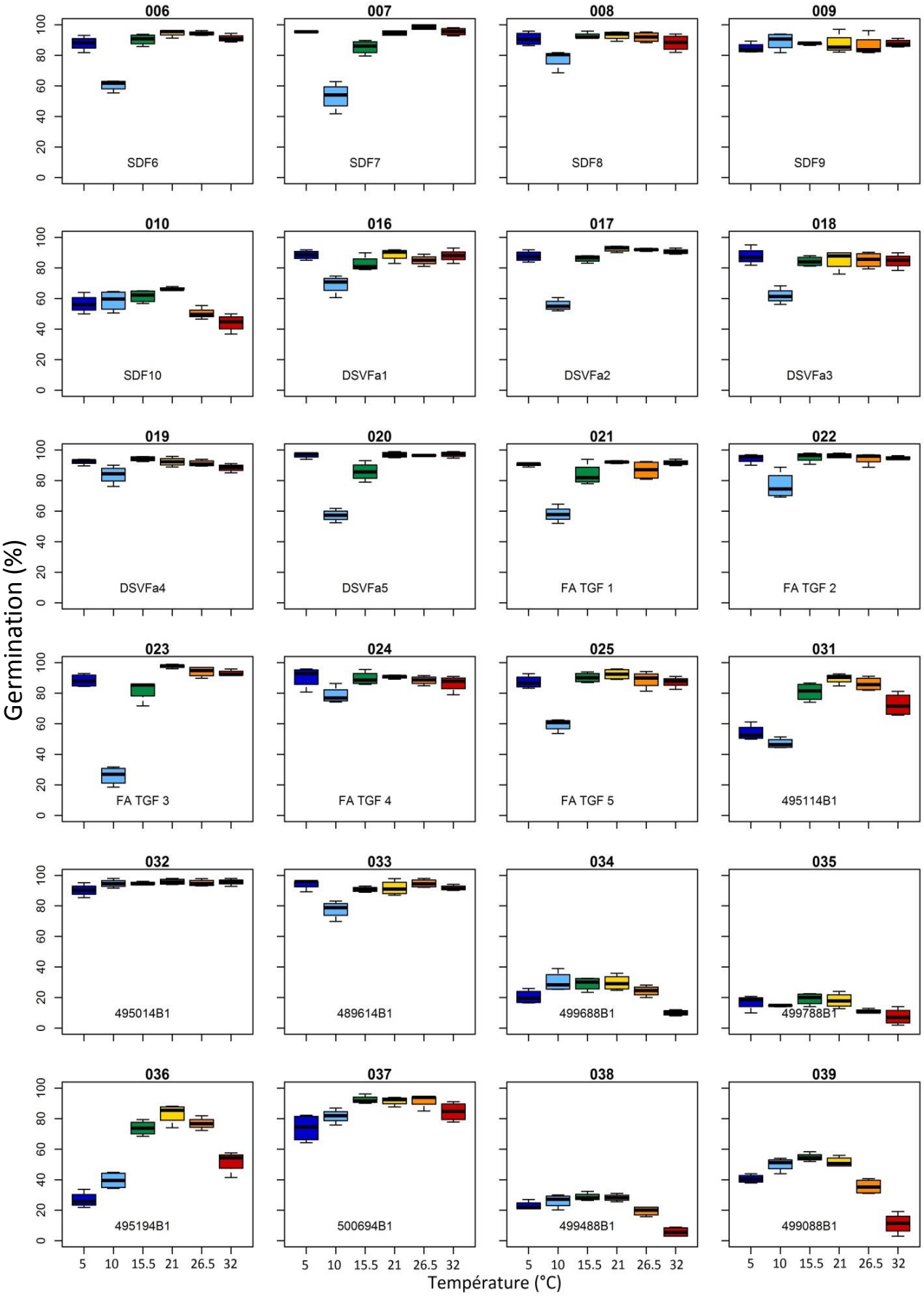
Annexe 2.1. Suite



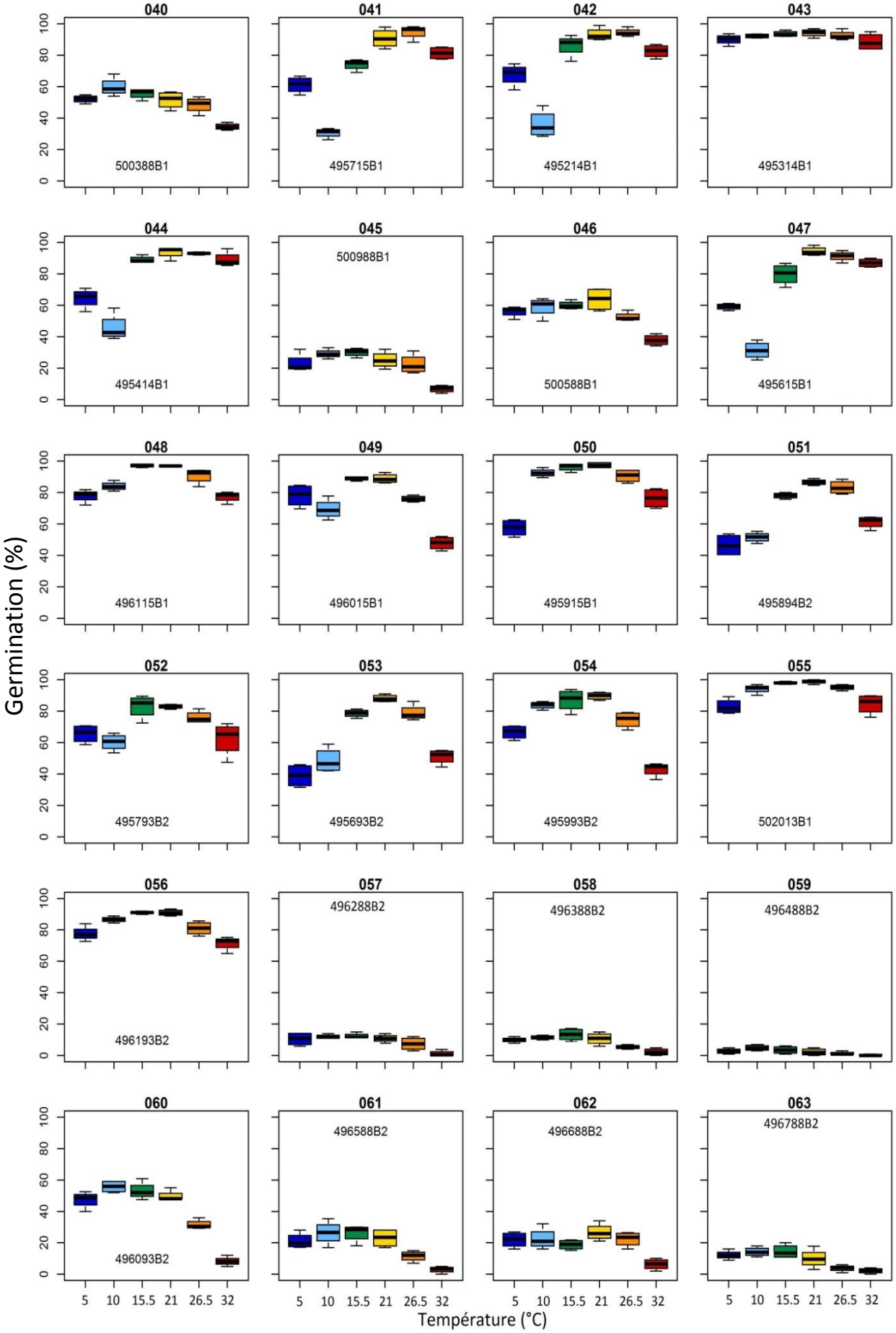
Annexe 2.1. Suite



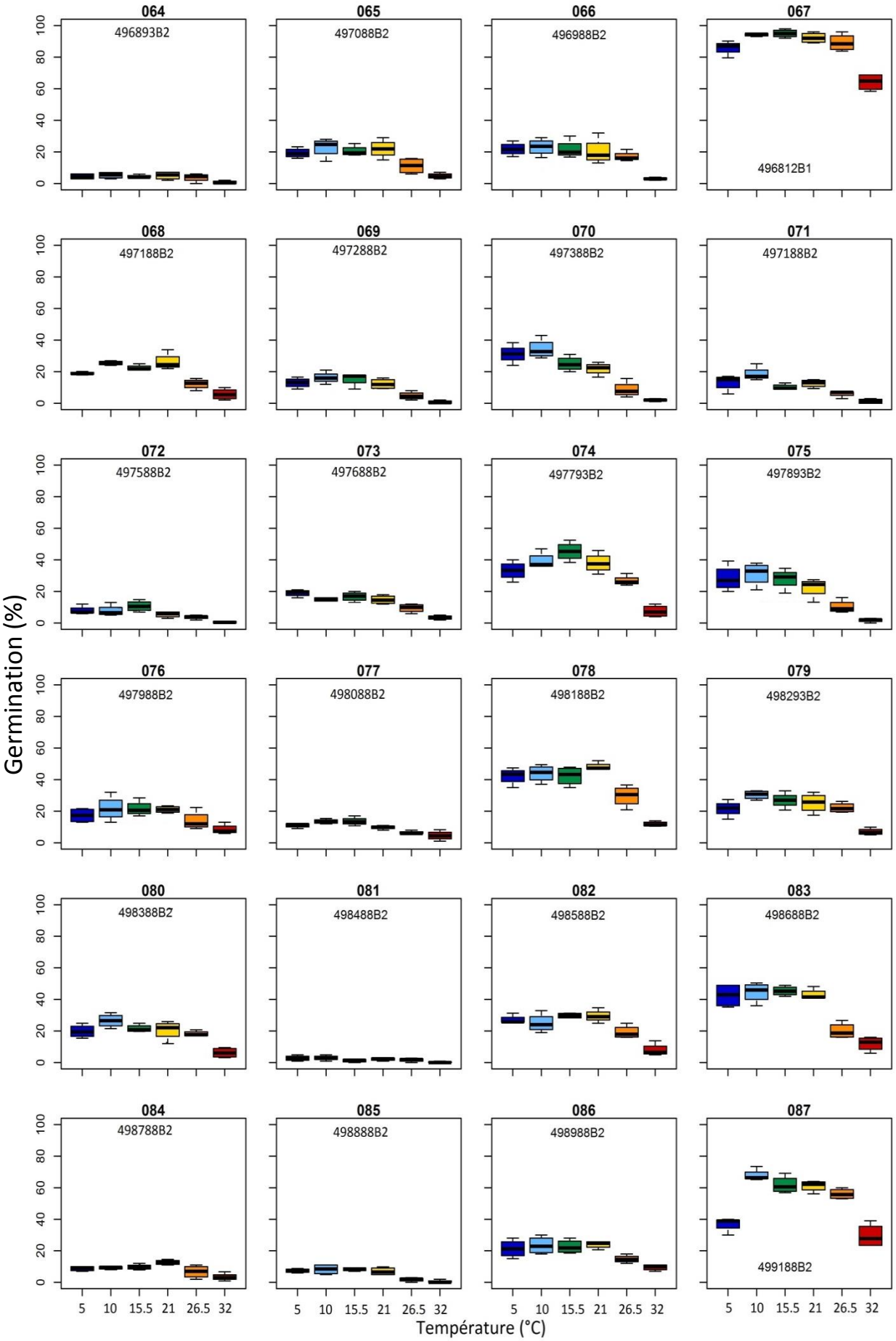
Annexe 2.2 : Boîtes à moustaches de chaque lot de graines de fétuque élevée, faits sur le pourcentage de germination observés à six température (5; 10; 15,5; 2; 26,5 et 32 °C).



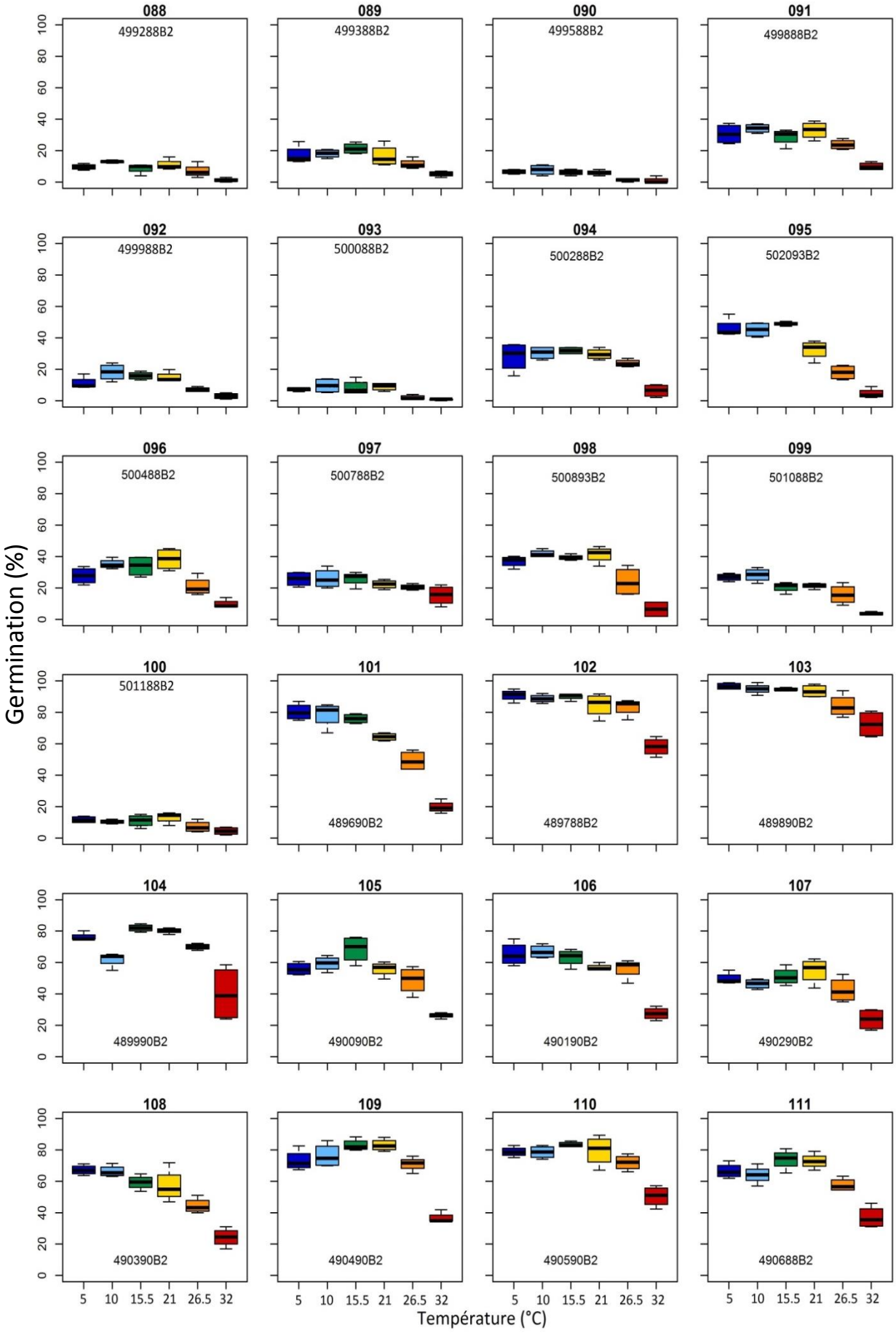
Annexe 2.2. Suite



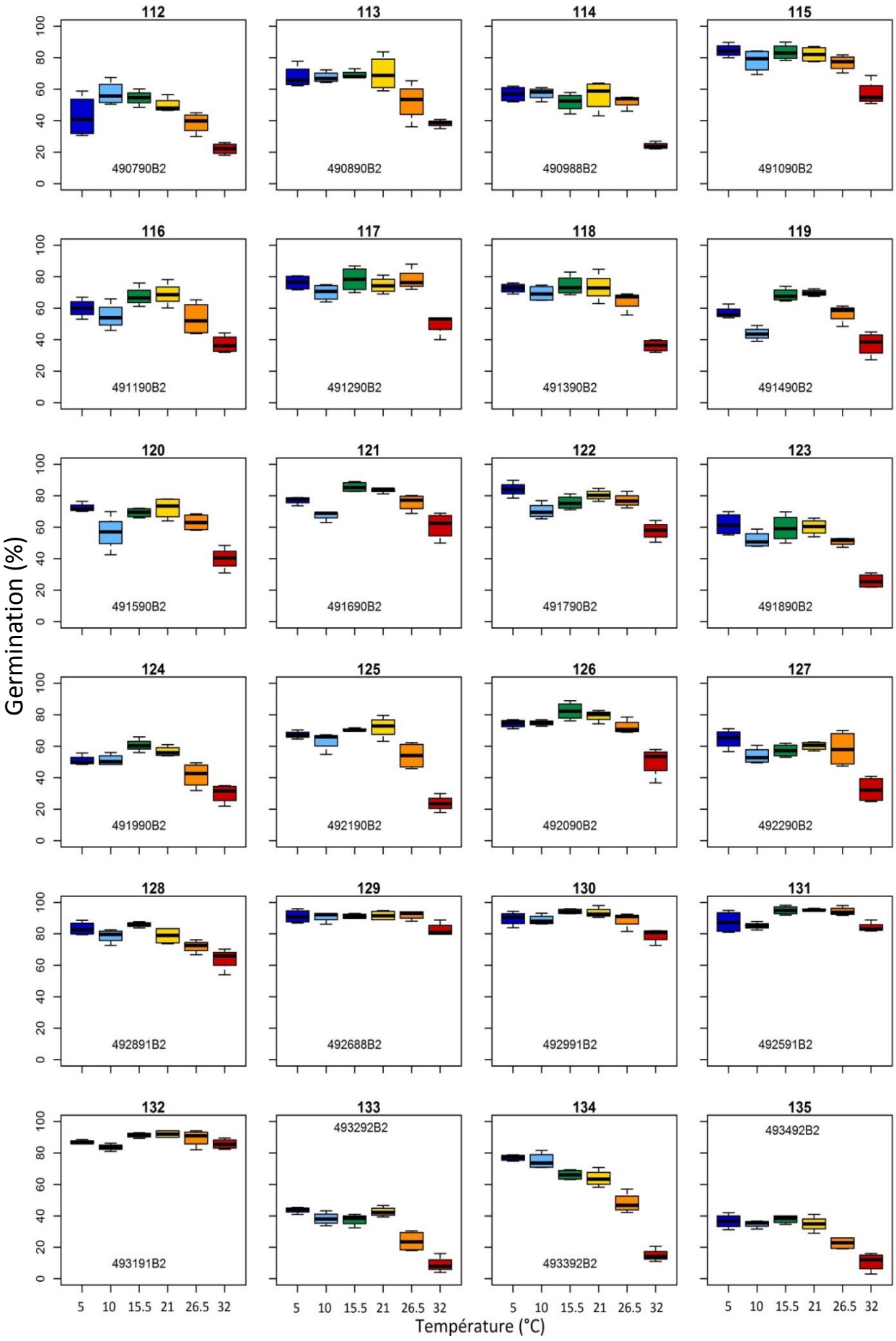
Annexe 2.2. Suite



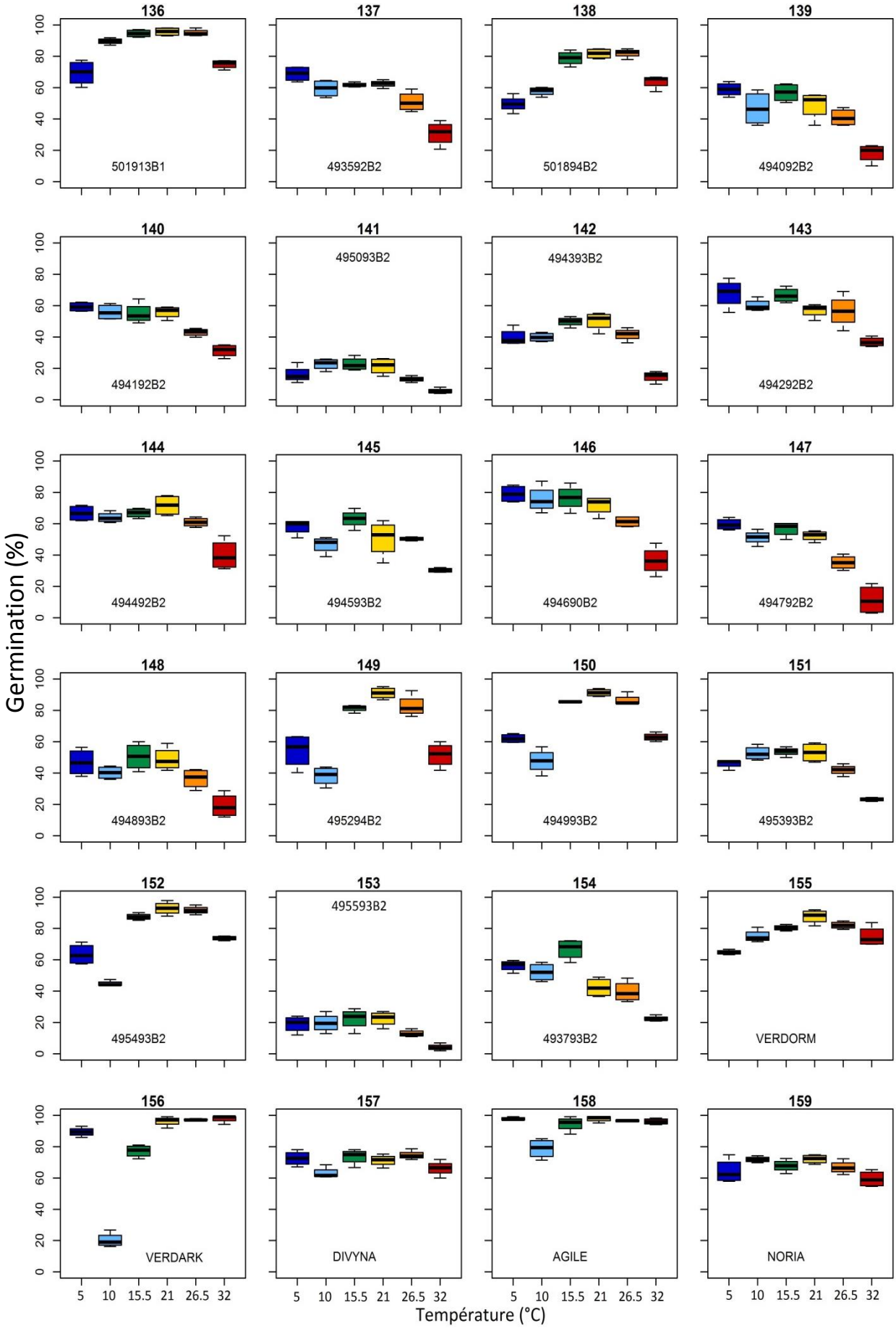
Annexe 2.2. Suite



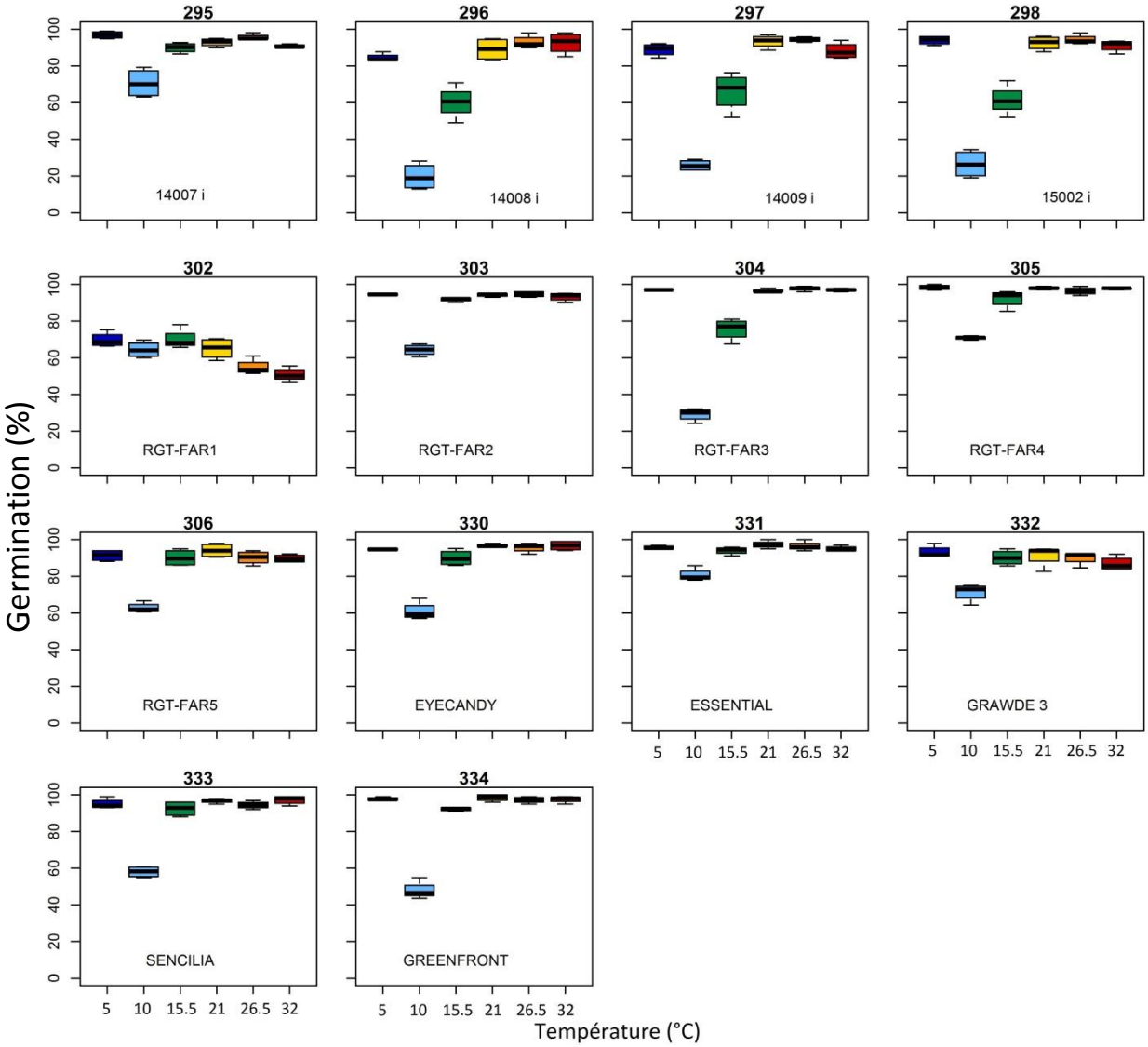
Annexe 2.2. Suite



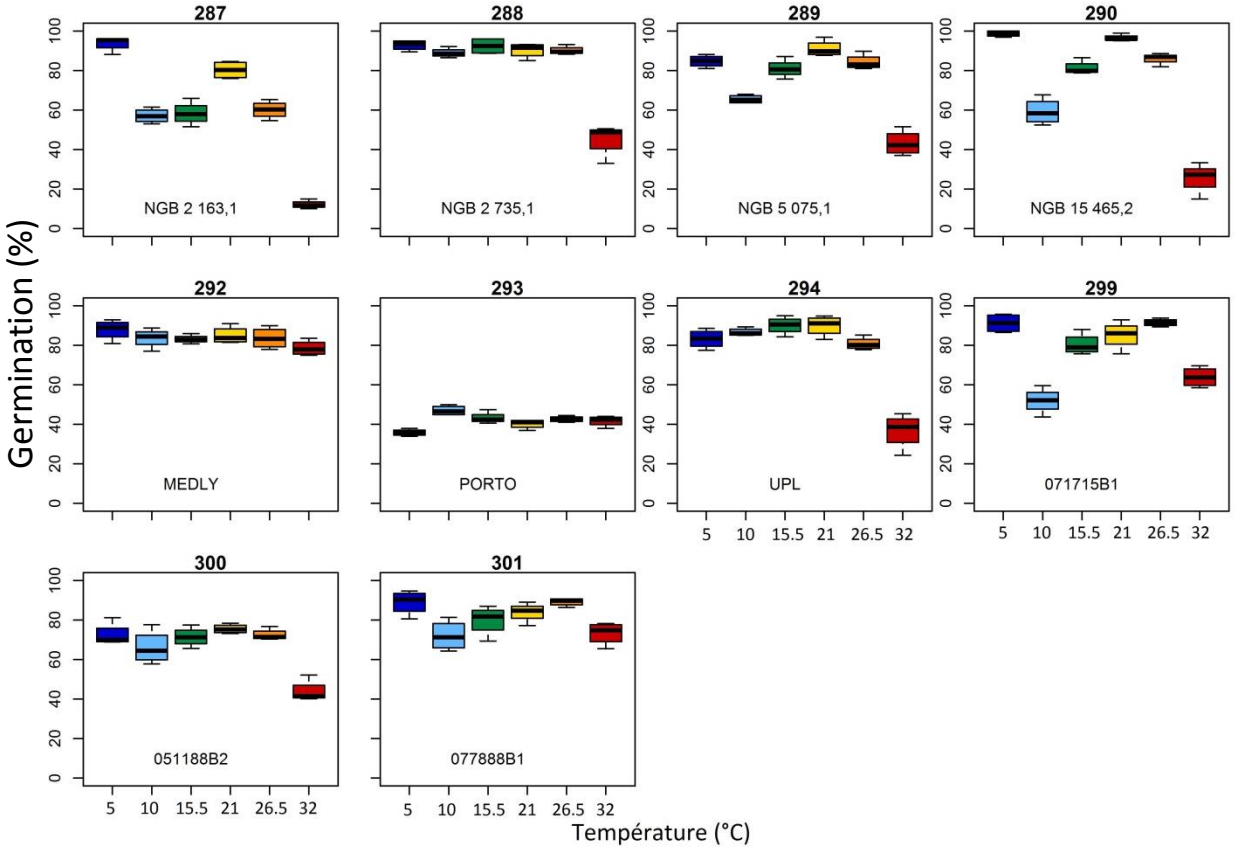
Annexe 2.2. Suite



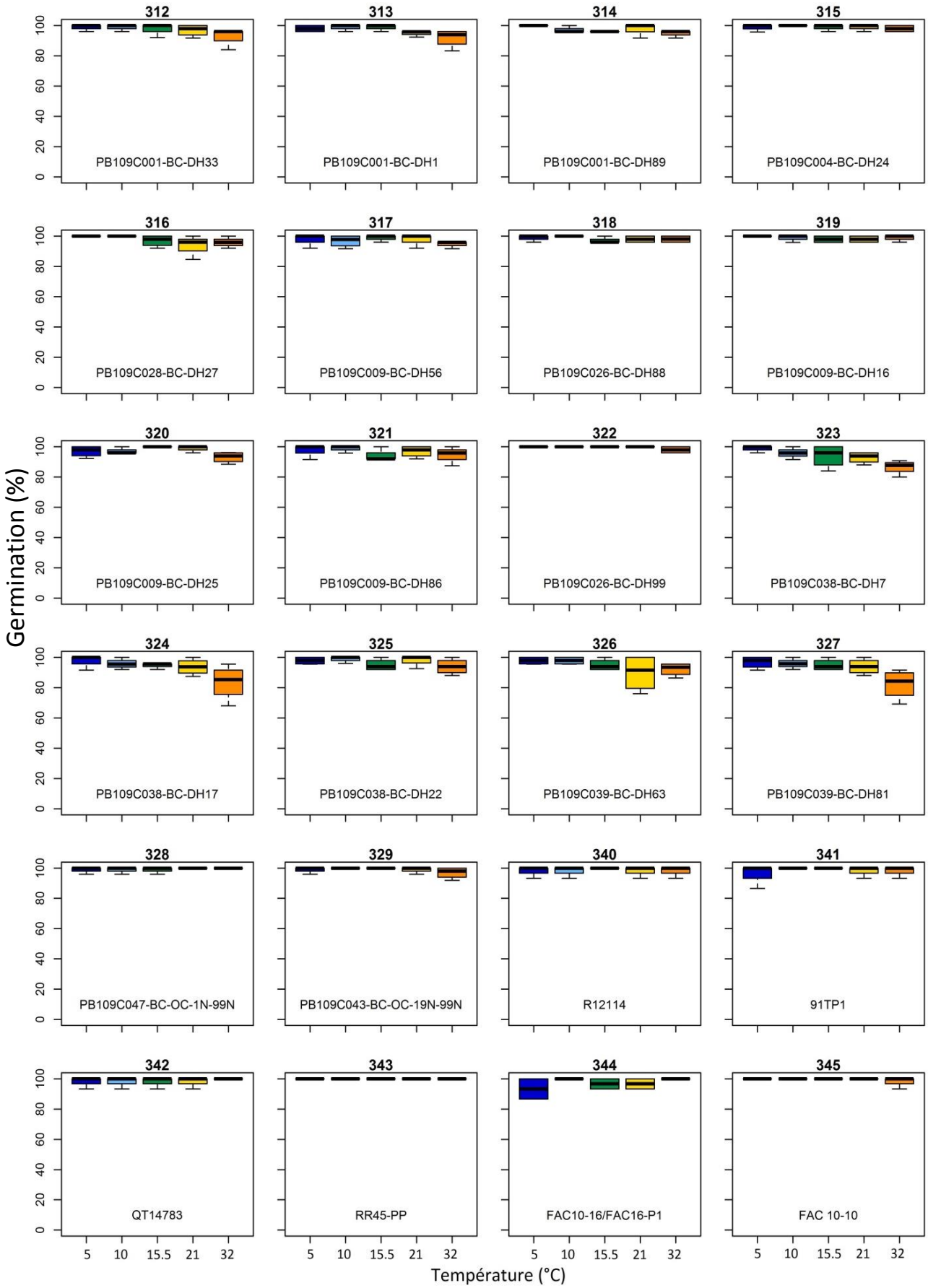
Annexe 2.2. Suite



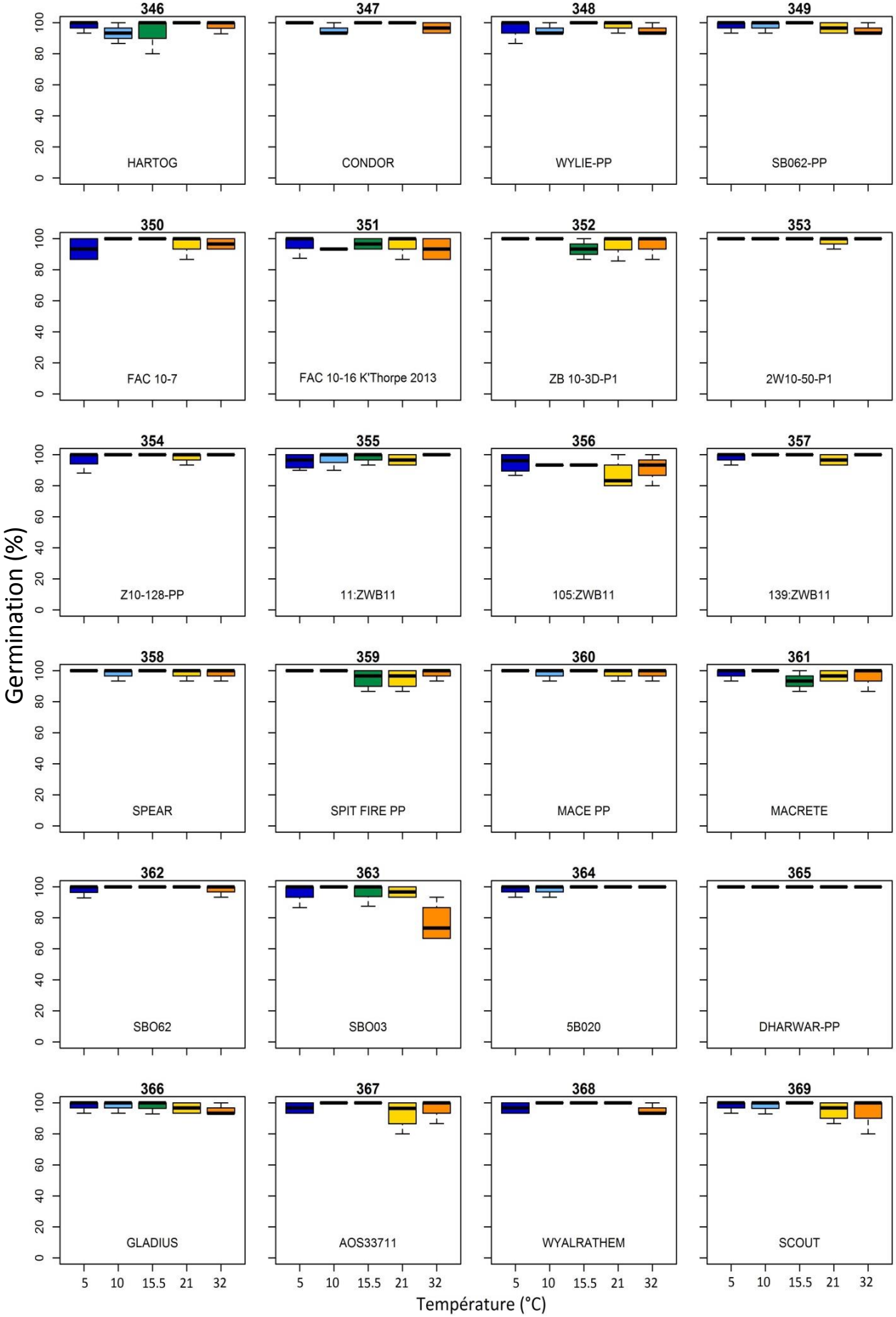
Annexe 2.3 : Boîtes à moustaches de chaque lot de graines de dactyle, faits sur le pourcentage de germination observés à six température (5; 10; 15,5; 2; 26,5 et 32 °C).



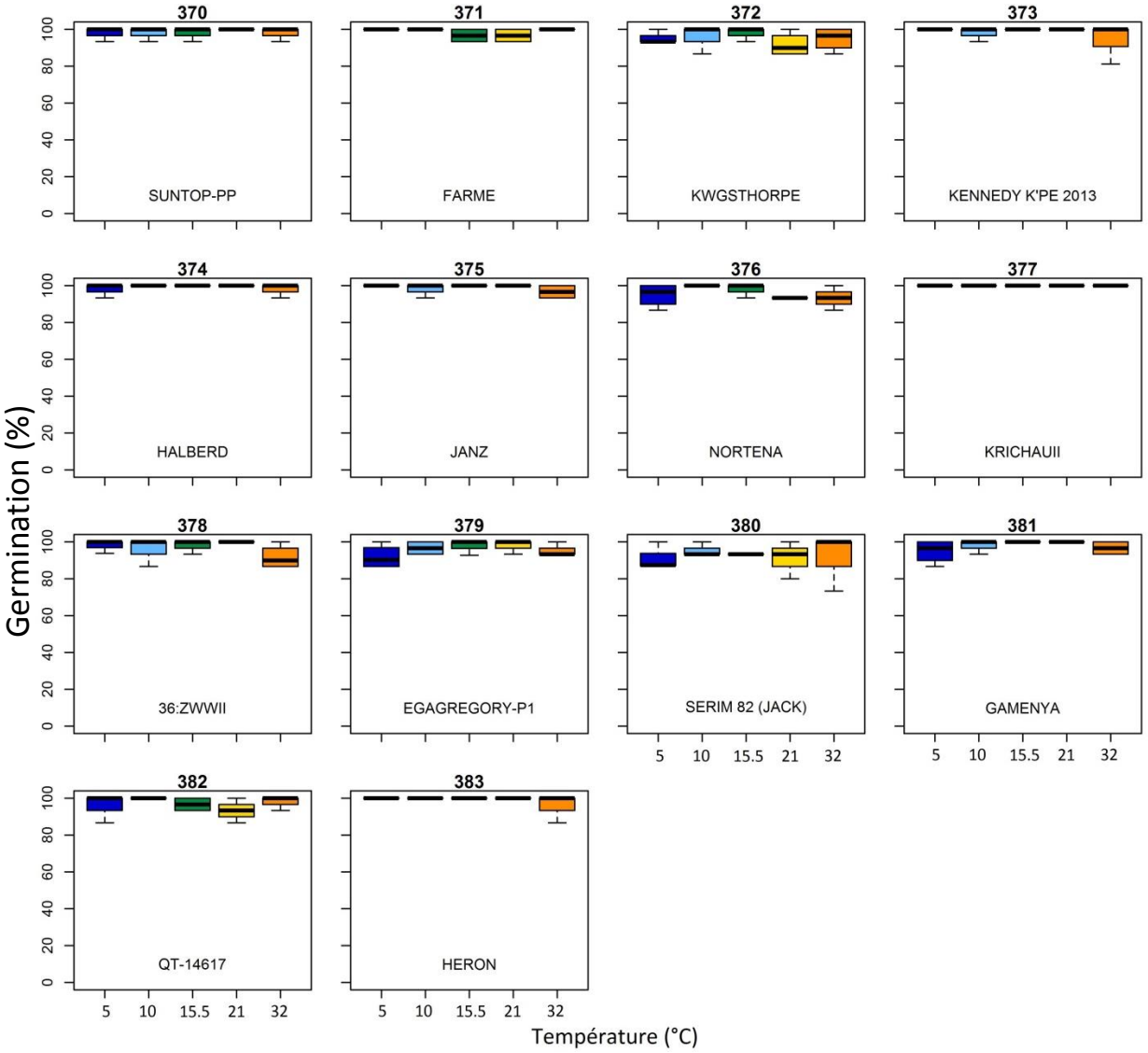
Annexe 2.4 : Boîtes à moustaches de chaque lot de graines de blé, faits sur le pourcentage de germination observés à six température (5; 10; 15,5; 2; 26,5 et 32 °C).



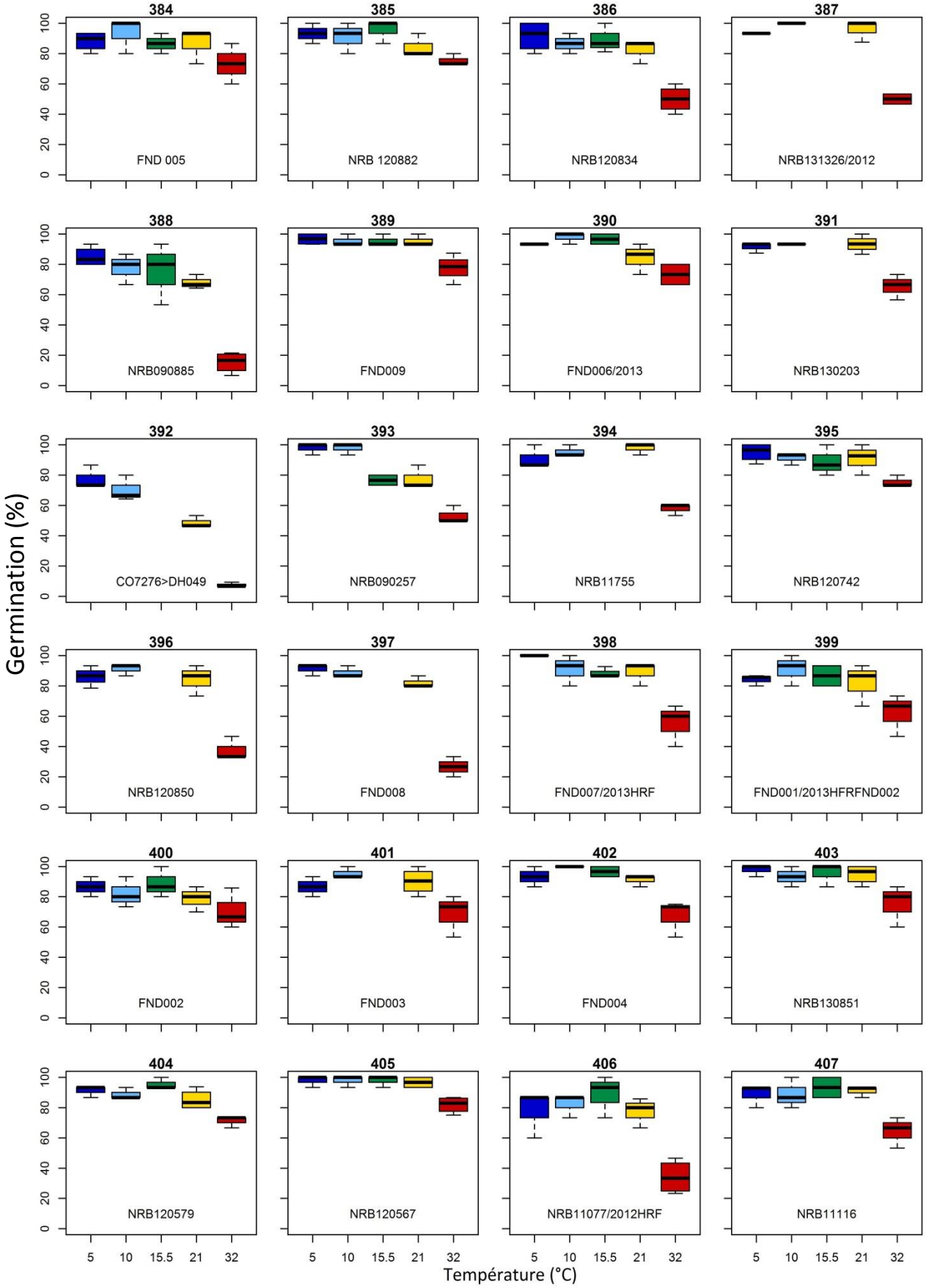
Annexe 2.4. Suite



Annexe 2.4. Suite



Annexe 2.5 : Boîtes à moustaches de chaque lot de graines d'orge, faits sur le pourcentage de germination observés à six température (5; 10; 15,5; 2; 26,5 et 32 °C).



Annexe 4.1 : les cinq marqueurs les plus significatifs dans chaque comparaison.

Comparé	Scaffold	POS	U value	Q value	Accession	Gène	Description
10 v 25-10	scaffold_2574|ref0003849	19389	8.30	0.00	XM_020291409.1	"LOC109732215"	Probable transcription factor At1g61730/protein coding
	scaffold_6323|ref0048355	1352	8.32	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_15147|ref0014153	3209	8.34	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_9647|ref0019440	5160	8.44	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_7427|ref0044376	33169	8.45	0.00		Pas d'annotions	
10 v 35	scaffold_46888|ref0021355	308	8.29	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_4656|ref0037344	20284	8.32	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_5|ref0040991	30281	8.32	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_130|ref0020074	203879	8.33	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_6375|ref0032193	34556	8.37	0.00	JN969603.1	"Lotte_7D23_1 LTR"	Retrotransposon Lotte_7D23_1
10 v 25-35	scaffold_11596|ref0004790	31337	8.34	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_41478|ref0034626	673	8.35	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_149|ref0025654	108742	8.37	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_19068|ref0030423	1666	8.38	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_12281|ref0017781	20889	8.44	0.00		Pas d'annotions	
10 v 25	scaffold_8793|ref0017067	33106	8.30	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_6701|ref0002608	43988	8.31	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_12457|ref0037585	20160	8.31	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_3469|ref0022613	42135	8.34	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_7427|ref0044376	33171	8.35	0.00		Pas d'annotions	
25-10 v 35	scaffold_1726|ref0018756	86417	8.30	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_2607|ref0042732	23052	8.34	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_17556|ref0014916	14002	8.38	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_7233|ref0035589	43484	8.39	0.00	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposon:Camilla_74D14_2
	scaffold_48327|ref0026526	800	8.42	0.00		Pas d'annotions	

Annexe 4.1. Suite

Comparé	Scaffold	POS	U value	Q value	Accession	Gène	Description
25-10 v 25-35	scaffold_2767|ref0015320	29980	8.32	0.00	AP017301.1	"nad4"	NADH dehydrogenase subunit 4 (mitochondrion)
	scaffold_12178|ref0036962	9830	8.37	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_26783|ref0008609	4286	8.37	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_2979|ref0030793	73174	8.38	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_19200|ref0021584	8800	8.43	0.00		Pas d'annotions	
25-10 v 25	scaffold_24209|ref0003469	6052	8.29	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_13074|ref0029220	22289	8.30	0.00	JN969603.1	"Lotte_7D23_1 LTR"	Retrotransposon Lotte_7D23_1
	scaffold_7427|ref0044376	33171	8.32	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_7233|ref0035589	43484	8.34	0.00	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposon:Camilla_74D14_2
	scaffold_3099|ref0011118	94410	8.36	0.00		Pas d'annotions	
35 v 25-35	scaffold_1726|ref0018756	86417	8.34	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_1901|ref0001344	69607	8.39	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_5321|ref0035440	6346	8.46	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_14443|ref0019734	26197	8.46	0.00	KM974751.1	"psbD"	Photosystem II protein D2 (plastid)
	scaffold_12178|ref0036962	9839	8.51	0.00		Pas d'annotions	
35 v 25	scaffold_17073|ref0018685	7399	8.31	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_5454|ref0004849	1526	8.32	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_45715|ref0013732	632	8.32	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_34564|ref0025385	1017	8.34	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_1561|ref0043375	84410	8.35	0.00		Pas d'annotions	
25-35 v 25	scaffold_17687|ref0043030	2101	8.31	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_19300|ref0006566	126	8.34	0.00	XM_020290833.1	"LOC109731663"	Non caractérisé / protein coding
					XM_020328343.1	"LOC109769602"	Cyanophora paradoxa High CO2, cDNA, mRNA sequence
	scaffold_4528|ref0038446	477	8.41	0.00	JX999996.1	"nad6"	NADH dehydrogenase subunit 1, (mitochondrion)
	scaffold_12457|ref0037585	20175	8.43	0.00		Pas d'annotions	
	scaffold_3223|ref0047938	41531	8.47	0.00		Pas d'annotions	

Annexe 4.2 : les marqueurs les plus répète dans différant comparaison. Chaque nombre dans la colonne de Comparé représente une comparaison entre des pools d'ADN (1= 10 v 25-10, 2= 10 v 35, 3= 10 v 25-35, 4= 10 v 25, 5= 25-10 v 35, 6= 25-10 v 25-35, 7= 25-10 v 25, 8= 35 v 25-35, 9= 35 v 25, 10= 25-35 v 25)

CCHROM	POS	Répétition	Comparé	Accession	Gène	Gene description
scaffold_39034|ref0033699	186	6	2, 3, 4, 5, 6,7		pas d'annotation	
scaffold_40666|ref0004428	571	6	2, 3, 4, 5, 6,7		pas d'annotation	
scaffold_30747|ref0020603	1391	6	2, 3, 4, 5, 6,7		pas d'annotation	
scaffold_476|ref0026821	75695	6	2, 3, 4, 5, 6,7	XM_010234839.1 XM_010234839.1	"LOC100842615" "LOC100826217"	Non caractérisé
scaffold_149|ref0025654	108792	6	3, 1, 6, 7, 8,9		pas d'annotation	
scaffold_1599|ref0025683	113988	6	2, 3, 4, 5, 6,7		pas d'annotation	
scaffold_2556|ref0016386	119901	6	2, 3, 4, 5, 6,7	XM_014896246.1 XM_024461599.1	"LOC106865663" "LOC104582174"	Non caractérisé
scaffold_35252|ref0009528	1231	6	3, 1, 6, 7, 8,9		pas d'annotation	
scaffold_5700|ref0031242	53887	5	2, 3, 4, 5,6		pas d'annotation	
scaffold_28216|ref0010844	5	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_37398|ref0006133	46	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_10021|ref0000389	58	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_43225|ref0026959	64	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_48338|ref0040372	267	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_46657|ref0045125	594	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_31929|ref0012217	920	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_5454|ref0004849	1471	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_18913|ref0002452	1687	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_19410|ref0026517	2259	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_29833|ref0014189	2334	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	

Annexe 2.2. Suite

CCHROM	POS	Répétition	Comparé	Accession	Gène	Gene description
scaffold_1583|ref0007522	2540	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_28938|ref0003569	3505	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_15978|ref0024506	5179	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_13461|ref0008691	5575	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_22848|ref0032570	5682	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_16648|ref0040018	6393	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_7443|ref0008480	9343	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_8784|ref0035016	9915	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_15936|ref0047670	10795	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_12457|ref0037585	20112	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_4179|ref0027181	21176	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_2848|ref0029390	21336	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_3696|ref0045218	24582	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_4102|ref0009159	37196	4	4, 7, 9,10	XM_020299468.1 XM_020344855.1	"LOC109740412" "LOC109786277"	Non caractérisé
scaffold_9180|ref0045078	40482	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_3223|ref0047938	41544	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_6047|ref0000265	45432	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_7851|ref0036152	49763	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_4079|ref0004433	50381	4	4, 7, 9,10	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposons Camilla_74D14_2
scaffold_5711|ref0000649	50901	4	4, 7, 9,10	XM_020294870.1	"LOC109735659"	Putrescine ydroxycinnamoyltransferase 1-like
				XM_003578088.4	"LOC100843305"	putrescine hydroxycinnamoyltransferase 1
				AP014965.1	Os09g0427550"	Non caractérisé

Annexe 2.2. Suite

CCHROM	POS	Répétition	Comparé	Accession	Gène	Gene description
scaffold_5408|ref0046164	65259	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_1184|ref0015284	68017	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_6101|ref0010517	73018	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_2128|ref0040785	92719	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_453|ref0014076	118499	4	4, 7, 9,10	XM_020332649.1	"LOC109773922"	cyclin-F2-2-like
scaffold_778|ref0042896	141324	4	4, 7, 9,10	JN969602.1	"Camilla_74D14_2 LTR"	Retrotransposons Camilla_74D14_2
scaffold_779|ref0042895	154586	4	4, 7, 9,10		pas d'annotation	
scaffold_40982|ref0007348	392	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_45606|ref0005351	751	4	1, 2, 3,4	XM_020295821.1	"LOC109736575"	
scaffold_7064|ref0030539	773	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_6215|ref0020338	1080	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_6323|ref0048355	1352	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_17171|ref0044771	2207	4	1, 2, 3,4	AP014964.1	"Os08g0398700"	
scaffold_30863|ref0039714	2266	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_15339|ref0037042	2309	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_18246|ref0025994	6869	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_19200|ref0021584	9268	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_5412|ref0023626	11679	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_7758|ref0022829	31658	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_7996|ref0016766	32482	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_6430|ref0002948	54527	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_1448|ref0021166	56933	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_2665|ref0005250	67274	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	

Annexe 2.2. Suite

CCHROM	POS	Répétition	Comparé	Accession	Gène	Gene description
scaffold_2531|ref0027264	67575	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_3862|ref0004424	72673	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_925|ref0043447	119294	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_74|ref0040686	193393	4	1, 2, 3,4		pas d'annotation	
scaffold_2262|ref0002508	35469	3	2, 3,4	XM_020329154.1	"LOC109770453"	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1-like