



HAL
open science

Déterminisme du nombre de grains chez le maïs (*Zea mays* L.) en déficit hydrique : rôles de la dynamique d'émergence des soies et du métabolisme carboné

Vincent Oury

► **To cite this version:**

Vincent Oury. Déterminisme du nombre de grains chez le maïs (*Zea mays* L.) en déficit hydrique : rôles de la dynamique d'émergence des soies et du métabolisme carboné. Biologie végétale. Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier, 2014. Français. NNT : . tel-02798221

HAL Id: tel-02798221

<https://hal.inrae.fr/tel-02798221>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par le
**Centre International d'Etudes Supérieures
en Sciences Agronomiques
Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE
Et de l'unité de recherche LEPSE

Spécialité : **Biologie Intégrative des Plantes**

Présentée par **Vincent OURY**

**Déterminisme du nombre de grains chez le maïs
(*Zea mays* L.) en déficit hydrique : rôles de la
dynamique d'émergence des soies et du
métabolisme carboné**

Directeur de thèse : **Dr François TARDIEU**

Co-directeur : **Dr Olivier TURC**

Soutenue le 13 juin 2014 devant le jury composé de :

Christophe SALON Directeur de recherche (INRA, Dijon)

Jan TRAAS Directeur de recherche (INRA, Lyon)

Evelyne COSTES Directrice de recherche (INRA, Montpellier)

Sandrine TRAVIER Maître de conférence (Université d'Angers)

François TARDIEU Directeur de recherche (INRA, Montpellier)

Olivier TURC Chargé de recherche (INRA, Montpellier)

Yves GIBON Directeur de recherche (INRA, Bordeaux)

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Invité

**CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES
EN SCIENCES AGRONOMIQUES
(Montpellier SupAgro)**

ECOLE DOCTORALE
**Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et
Environnement
(SIBAGHE)**

DOCTORAT
Spécialité : Biologie Intégrative des plantes

Vincent OURY

**Déterminisme du nombre de grains chez le maïs (*Zea mays* L.) en
déficit hydrique : rôles de la dynamique d'émergence des soies et du
métabolisme carboné**

Directeur de thèse : Dr François TARDIEU

Co-directeur : Dr Olivier TURC

Soutenue le 13 juin 2014

Membres du Jury :

Christophe SALON Directeur de recherche (INRA, Dijon)	Rapporteur
Jan TRAAS Directeur de recherche (INRA, Lyon)	Rapporteur
Evelyne COSTES Directrice de recherche (INRA, Montpellier)	Examinatrice
Sandrine TRAVIER Maître de conférence (Université d'Angers)	Examinatrice
François TARDIEU Directeur de recherche (INRA, Montpellier)	Directeur de thèse
Olivier TURC Chargé de recherche (INRA, Montpellier)	Co-directeur de thèse
Yves GIBON Directeur de recherche (INRA, Bordeaux)	Invité

Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux - LEPSE

Institut National de la Recherche Agronomique - INRA
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Résumé : L'avortement des grains est l'une des premières causes de pertes de rendement chez le maïs en déficit hydrique. Il est le plus souvent attribué à un défaut d'approvisionnement carboné des ovaires. Nous avons testé le lien entre l'avortement et i) le développement des cohortes d'ovaires, ii) la cinétique d'émergence des soies, et iii) la disponibilité en carbone pour les ovaires, caractérisée par les quantités et concentrations en métabolites carbonés, ainsi que par les activités et abondances de transcrits d'enzymes clés à 3 stades de développement autour de la floraison. L'état carboné de la plante et des ovaires étaient favorables en déficit hydrique, rendant peu probable un avortement lié au métabolisme carboné. L'avortement a concerné les plus jeunes ovaires, situés en position apicale de l'épi. Il était consécutif à la perturbation de la croissance des soies qui a modifié leur cinétique d'émergence, réduisant ainsi le nombre de soies émergées. Le nombre final de grains était clairement lié au nombre de soies émergées lors de trois expériences concernant différentes intensités de déficit hydrique et 4 génotypes. Un mécanisme indépendant du carbone déclenche donc l'avortement dès l'émergence des soies, lors de la fertilisation des premiers ovaires. Il se produit avant l'avortement lié au manque de carbone classiquement décrit dans la littérature, et pourrait expliquer la majorité des pertes de rendements lors de périodes de sécheresse au champ. Ce travail ouvre des perspectives nouvelles pour la sélection et la modélisation du maïs en situation de manque d'eau.

Mots clés : Avortement, déficit hydrique, développement, ovaire, soies, grain, sucres solubles, invertases, maïs, croissance, reproduction

Title: Determinism of grain number in maize (*Zea mays* L.) under water deficit: roles of silk emergence and of carbon metabolism

Abstract : Grain abortion is a major cause of yield loss in maize under water deficit. It is widely believed to be caused by photosynthate deprivation in ovaries. We have tested the link between abortion and (i) the development of ovary cohorts, (ii) the timing of maize silk emergence, and (iii) photosynthate availability, analysed via the amounts and concentrations of metabolites, together with the activities and transcript abundances of key enzymes at 3 dates around silk emergence. Plant and ovary carbon status were favourable under water deficit so a carbon-related abortion was unlikely. Abortion involved youngest ovaries, located at the ear apex. It resulted from a decreased silk growth that affected the dynamics of silk emergence, thereby limiting the number of emerged silks. Final grain number was accounted for by the number of emerged silks in three experiments with contrasting watering treatments and 4 genotypes. Hence, a switch to abortion occurred at silk emergence, when the first ovary fertilizations occurred, and before the period with classically described carbon-related abortion. The carbon-independent ovary abortion linked to the dynamics of silk emergence probably represents the major proportion of aborted grains in most drought scenarios in the field. This work opens new perspectives for breeding and for modelling the behaviour of maize in water deficit.

Key words: Abortion, water deficit, development, ovary, silk, grain, carbohydrates, invertase, maize, growth, reproduction

**UMR Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux –
LEPSE**

**Campus INRA / Montpellier SupAgro
2, place Pierre Viala
34060 Montpellier Cedex 2**

Remerciements

Ce travail de thèse est la conclusion de quatre années intenses et fortes en émotions. Il est surtout le résultat d'un effort collectif, et n'aurait pas été possible sans le soutien humain et technique de nombreuses personnes, à qui j'aimerais exprimer ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier Olivier Turc, pour ces quatre années passées ensemble à « avorter » du maïs ! Je le remercie pour sa confiance et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dont le sujet s'est avéré passionnant. J'ai adoré ce sujet ! Je le remercie plus particulièrement pour sa patience infinie et sa disponibilité, mais aussi pour son implication à toutes les étapes de cette thèse. Je reconnais avoir été souvent perdu dans des concepts qui ne m'étaient pas familiers à mon arrivée au LEPSE. Mais Olivier a toujours été là. Je nous revois à trimbaler des plants de 3m dans un cadi de supermarché d'un bout à l'autre de SupAgro, ou encore pleurer devant la bonbonne d'azote liquide... vide !

Merci pour tout Olivier !

Je tiens à remercier François Tardieu, là aussi pour sa confiance et l'opportunité de cette thèse. Je le remercie plus particulièrement pour son aide précieuse quant à la rédaction de ce manuscrit, et pour sa pertinence. Ce sujet, a été la source de nombreux débats, parfois passionnés, l'« avortement » est toujours un sujet compliqué... ! Mais les échanges avec François ont toujours été très formateurs, et l'une des chances de cette thèse est d'avoir eu l'opportunité de travailler avec lui. Enfin je m'excuse pour les sachets d'aspirine...

Une autre personne centrale de cette thèse c'est Ivan Peironnenche mon co-équipier de toutes les missions, qui m'a aidé à peser, à arroser, à couper, à décortiquer, à mesurer, à broyer, à aliquoter, etc... de jour comme de nuit, les centaines de plants de maïs utilisés durant cette thèse. Cette dernière n'aurait pas été possible sans lui et son entrain à toute épreuve. Grâce à lui toutes les étapes fastidieuses resteront des instants mémorables, et font partie de mes meilleurs souvenirs de thèse.

Je remercie ensuite Stéphane Berthézène et Myriam Dauzat, pour leur professionnalisme, leur réactivité, leur investissement, et leur bienveillance. Une thèse est un enchaînement de petites victoires et de gros échecs. Mais grâce à eux les petites victoires, comme le bon déroulement d'une manipe, ont été très nombreuses. Je les remercie donc infiniment pour leur travail et leur passion qui sont les fondations de ce travail de thèse.

Je remercie aussi Duyên Prodhomme, pour son accueil sur la Plateforme Métabolomique de Bordeaux, sa patience et sa bienveillance vis-à-vis de mes ovaires de maïs. Je la remercie chaleureusement car elle a fourni un travail considérable durant cette thèse qui doit être souligné.

Je remercie Yves Gibon, là aussi, pour son accueil chaleureux à Bordeaux, son ouverture et notre partie de babyfoot... désolé Yves de t'avoir fait vivre ta « première » défaite (en tant que coéquipiers) !

Je tiens ensuite à remercier toutes les « petites » mains qui ont directement contribué à ce travail de thèse. Je remercie donc tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé, Thierry Lamy, Laura Frenoir, Célia Péquignot et Julia Soewarto. Je les remercie car cette thèse est le fruit de leur effort. Je les remercie de m'avoir supporté, et je pense que comme moi, ils ne regarderont plus jamais un grain ou un épi de maïs de la même façon... Pour ma part j'ai adoré manipuler avec eux, et pouvoir partager une passion et une curiosité communes, regarder pousser les plantes !

Je remercie David Verney, pour son amitié, sa rigueur, son professionnalisme et sa passion, qui ont fortement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je le remercie pour son acharnement au champ et pour ses comptages de soies « magnifiques » ! Ça a été un pur plaisir de travailler avec David. Il a été un réel soutien pour un thésard en fin course qui commençait à boiter...

Je remercie Cloé Check, pour sa patience et sa méticulosité, car cette dernière a passé deux étés à compter des soies de maïs. Je la remercie aussi pour son amitié, son soutien et sa joie de vivre qui ont su égayer les comptages fastidieux de milliers de soies et nos manipes au champ. Je me souviendrai toujours de cette fille en robe de soirée en train de s'embourber dans la gadoue d'un champ de maïs qui vient d'être arrosé... Merci pour ces moments fabuleux !

Je remercie aussi chaleureusement, Carine, Erwan et Sarah pour leur aide précieuse et les fous rires partagés.

Je tiens à remercier Pierre-Eric Lauri et Claude Edelin pour leur apprentissage, leurs conseils et leur soutien durant toute ma formation. Si j'en suis là, c'est grâce à eux !

J'ai une pensée particulière pour Justine Bresson, Alexis Bédiée, Emilie Millet, Cecilio F. Caldeira, et Christelle Taochy. Partenaires de bureau ou thésards, j'ai partagé avec eux ces quatre années de thèse. Ils ont souvent été en première ligne de mes coups de stress. Je les remercie de m'avoir supporté et souvent consolé...

Enfin je veux remercier l'intégralité du LEPSE pour leur accueil, leur aide, nos parties de pétanque du midi, nos discussions enflammées, et pour ces années partagées à leur côté. Ce labo est génial et je suis fier d'y avoir travaillé. Pour être honnête j'ai rêvé de faire ma thèse au LEPSE, toutes ces serres, ces automates, ces LICORs et autres appareillages magiques, ne seraient rien sans les personnes qui les ont créés, qui les bichonnent ou qui les utilisent. J'ai énormément appris à leur côté et une thèse est sans doute l'une des expériences les plus intenses d'une vie. Merci pour tout !

Je dédie cette thèse à ma grand-mère Denise Oury, qui m'a appris à regarder, à aimer et à respecter la magie des végétaux, et m'a inculqué sa passion, de cultiver notre jardin...

SOMMAIRE

Chapitre 1 : Introduction	8
1.1. Histoire et domestication du maïs	8
1.2. Le maïs d'aujourd'hui	9
1.2.1. Le maïs et la révolution verte	9
1.2.2. Aires de culture, productions et rendements	10
1.2.3. Usage et consommation	12
1.3. Botanique et biologie du maïs	12
1.3.1. Taxonomie	12
1.3.2. Description générale	13
1.3.3. Morphologie des inflorescences	14
1.3.4. Biologie	16
1.4. Impact de la sécheresse à la floraison sur le rendement chez le maïs	18
1.5. L'avortement des grains de maïs lors de déficit hydrique est-il fonction de l'assimilation carbonée ?	20
1.6. Rôle de la dynamique de floraison du maïs sur le déterminisme du nombre de grains	22
1.6.1. Effet du synchronisme des floraisons mâle et femelle et de la cinétique de pollinisation des ovaires le long de l'épi	22
1.6.2. Effet du déficit hydrique sur la dynamique de floraison du maïs	23
1.7. Démarche expérimentale	24
1.7.1. Test de l'hypothèse basée sur la dynamique de floraison femelle et identification du meilleur prédicteur du rendement : l'ovaire ou sa soie	24
1.7.2. Test de l'hypothèse d'une carence carbonée : caractérisation des événements métaboliques et développementaux qui mènent à l'avortement de l'ovaire	25
Chapitre 2 : The sequential development of silks is a major cause of ovary abortion in maize under water deficit	26
Summary	27
Introduction	28
Materials and methods	30
Results	33
Discussion	39
Conclusion	44
Chapitre 3 : Moderate water deficit causes ovary abortion in maize without appreciable change in plant or ovary carbon status	45
Summary	46
Introduction	47
Material and methods	49

Results	52
Discussion	56
Conclusion	60
Chapitre 4 : Discussion générale	61
4.1. Le rôle central de la croissance des soies dans le déterminisme du nombre de grains chez le maïs en déficit hydrique	61
4.2. Perspectives pour la sélection : les leviers d'actions pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse du maïs	62
4.3. Impact sur la modélisation du rendement du maïs sous déficit hydrique	64
Conclusion générale	65
Références	66



Figure 1-1 L'une des premières représentations publiées du maïs. Extrait d'une édition de *Pen-tsao Kang-mu* (recueil le plus complet de la médecine chinoise) écrit par Li Shizhen et publiée vers 1600. Les trois symboles de la légende originale constituent le mot chinois pour le maïs, *Shu-cho-yü*. La traduction littérale signifie « la céréale des terres de l'ouest, aux traits de pierre précieuse ». Image extraite de : *The story of the maize plant*, de Paul Weatherwax publié en 1923.

Chapitre 1 : Introduction

Le maïs est l'une des plantes les plus cultivées dans le monde essentiellement pour son grain riche en amidon. Il est l'aliment de base dans de nombreux pays d'Amérique centrale et du Sud de l'Afrique. Il est par ailleurs fortement utilisé comme aliment pour le bétail, et dans les industries agroalimentaire et chimique qui dépendent du maïs comme matière première. La demande en maïs est en constante progression et la production mondiale suffit juste à satisfaire cette demande. La production de maïs est particulièrement dépendante des ressources en eau car une période de sécheresse provoque des pertes de rendement importantes. Celles-ci entraînent des augmentations du prix du maïs sur le marché mondial (Shiferaw *et al.*, 2011), qui compromettent la sécurité alimentaire de nombreux pays qui dépendent du maïs et dont l'économie ne peut amortir les hausses de prix. Dans le contexte du changement climatique et de l'essor des nouvelles industries telles les bioénergies ou les bioplastiques, l'amélioration de la tolérance à la sécheresse du maïs apparaît comme un facteur essentiel pour le maintien de la sécurité alimentaire de nombreux pays en développement.

1.1. Histoire et domestication du maïs

L'histoire du maïs débute sur le continent américain et est intimement liée à l'histoire méconnue des innombrables peuples *Amérindiens*, dont les plus célèbres sont les Aztèques, les Mayas, les Iroquois, les Mohicans, les Sioux, les Apaches, ou encore les Hopis. Ces peuples bien que très différents de par leur culture et leur situation géographique, avaient tous en commun un même aliment de base : le maïs. Le maïs était traditionnellement cultivé en association avec deux autres espèces : le haricot et la courge (cette technique, dite des *trois sœurs*, est aujourd'hui un modèle de culture raisonnée). Dans la mémoire occidentale l'histoire du maïs commence par sa découverte par l'homme de l'ancien monde, c'est-à-dire, à son introduction par Christophe Colomb qui lui donna son nom moderne « *mays* » à la fin du 15^{ème} siècle. Le maïs possède beaucoup d'autres noms en fonction des régions du monde, comme : blé d'Inde, blé turc, blé de Sicile, blé de Rome, etc., qui témoignent souvent de sa route d'introduction. Il se répandit rapidement de par l'Afrique en Egypte et dans le golfe de Guinée, et l'Eurasie pour arriver jusqu'en Chine, où sa présence est mentionnée à partir de la fin du 16^{ème} siècle (Fig. 1-1).

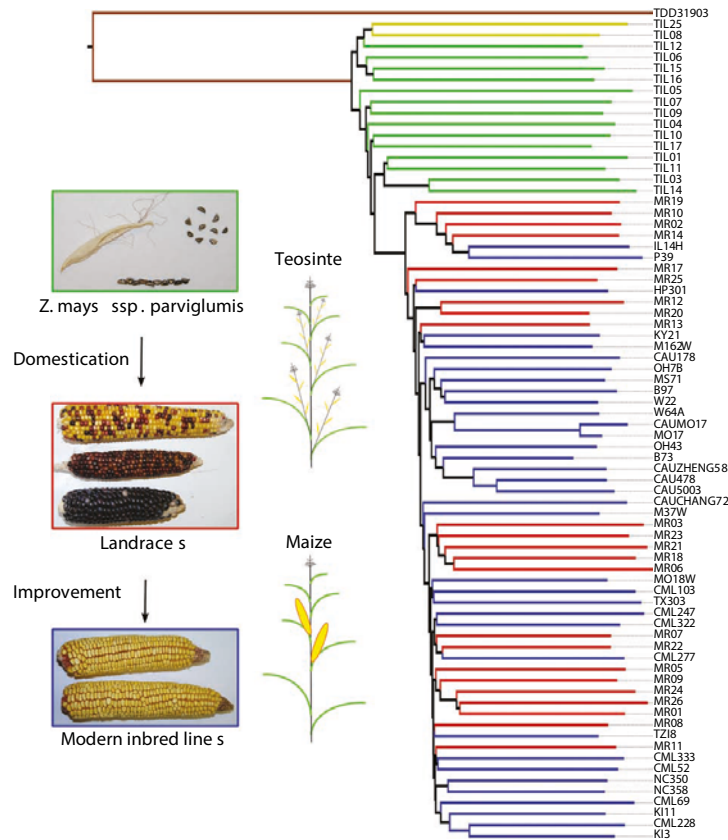


Figure 1-2 Arbre phylogénétique et changement morphologique du maïs domestiqué et de ses parents sauvages. Les Taxa dans l’arbre phylogénétique (droite) sont représentés par différentes couleurs : parviglumis (vert), landraces (rouge), variétés commerciales (bleu), mexicana (jaune) and *Tripsacum* (marron). Les changements morphologiques générés par la domestication et la sélection (gauche) sont montrés pour les inflorescences femelles (épis) et l’architecture de la plante. Extrait de Hufford *et al.* (2012).

A sa découverte par Christophe Colomb, le maïs était un élément fondamental des civilisations humaines des deux Amériques. Ces civilisations l'élevèrent très souvent au rang de divinité, et son interaction avec les *Amérindiens* est très ancienne. L'origine du maïs a été beaucoup discutée, mais les analyses moléculaires tendent à démontrer que le maïs a été obtenu à travers la domestication d'une téosinte annuelle, la téosinte Balsas (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) au Mexique 7000 ans av. J-C (Warburton *et al.*, 2011; Hufford *et al.*, 2012, Fig. 1-2). La grande diversité morphologique du maïs et l'hybridation possible avec la majorité des espèces et sous-espèces de téosintes suggèrent que le maïs domestiqué a subi de multiples croisements avec différentes téosintes après sa domestication. A partir de -3000 av. J-C, le maïs se retrouve à travers toute l'Amérique centrale, des Andes au Mexique, en passant par les Caraïbes. Enfin 1000 av. J-C la culture du maïs s'étendit à l'Amérique du Nord, donnant naissance aux principales populations de maïs acclimatées aux climats tempérés. Cette aire de répartition importante, à travers des environnements contrastés, et la facilité d'hybridation du maïs avec les différentes téosintes et d'autres espèces du genre *Tripsacum*, sont autant d'éléments qui rendent compte de la grande diversité génétique et phénotypique observée chez le maïs. A l'heure actuelle, 4 populations ancestrales sont distinguées au sein de la sous-espèce du maïs domestique (*Zea mays* ssp. *mays*) en fonction de leur répartition sur le continent américain, celles : i) des hauts plateaux du Mexique, ii) des plaines tropicales, iii) des Andes, et iv) du nord des Etats-Unis (Vigouroux *et al.*, 2008, Fig. 1-3).

1.2. Le maïs d'aujourd'hui

1.2.1. Le maïs et la révolution verte

Le maïs est le résultat d'une sélection massale réalisée par les *Amérindiens* pendant plusieurs milliers d'années et qui lui a donné la forme qu'on lui connaît. Bien que le maïs soit aujourd'hui cultivé dans toutes les régions du monde, ses taux de production et sa culture n'ont que tardivement évolué depuis sa découverte par Christophe Colomb. Cette évolution est marquée par le développement de la sélection variétale moderne basée sur les travaux de Mendel (1866) et l'apparition de semences hybrides à la fin de la seconde guerre mondiale (Figure 1-4). Une seconde étape est marquée lors de la création de l'UPOV (Union pour la Protection des Obtentions Végétales) qui marque le début de la *révolution verte*. L'UPOV créée en 1961 à

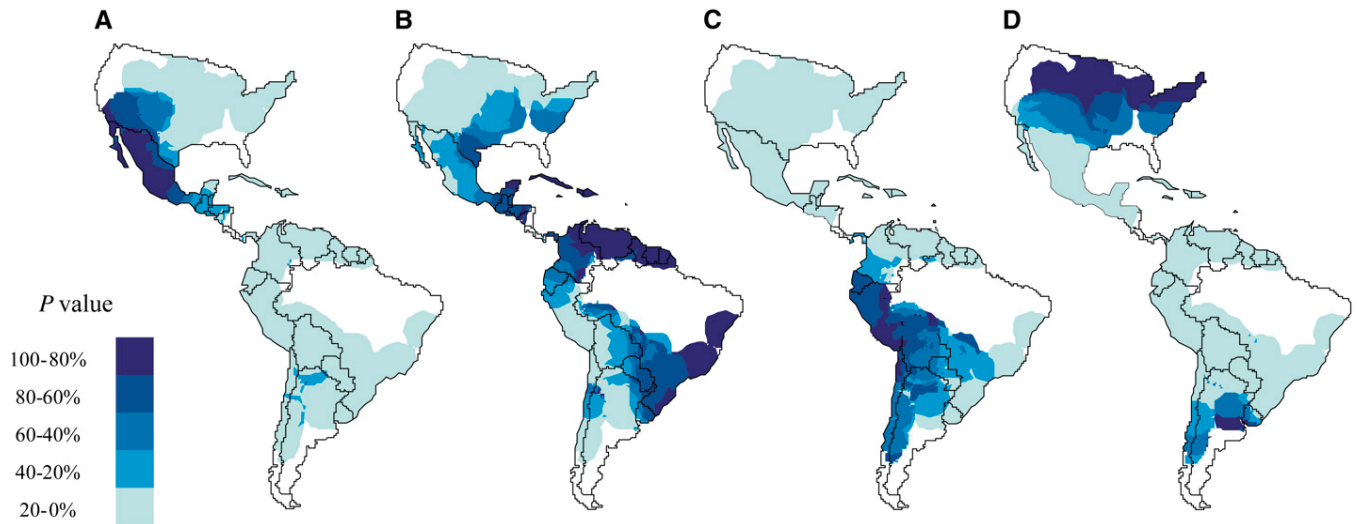


Figure 1-3 Représentation géographique de la composition des races ancestrales de maïs estimée par le programme Structure. Une carte est présentée pour chaque des 4 principales clusters détectés, sur laquelle est représenté le pourcentage de descendance du cluster : (A) les hauts plateaux du Mexique, (B) les plaines tropicales, (C) les Andes, et (C) le nord des Etats-Unis. Extrait de Vigouroux *et al.* (2008).

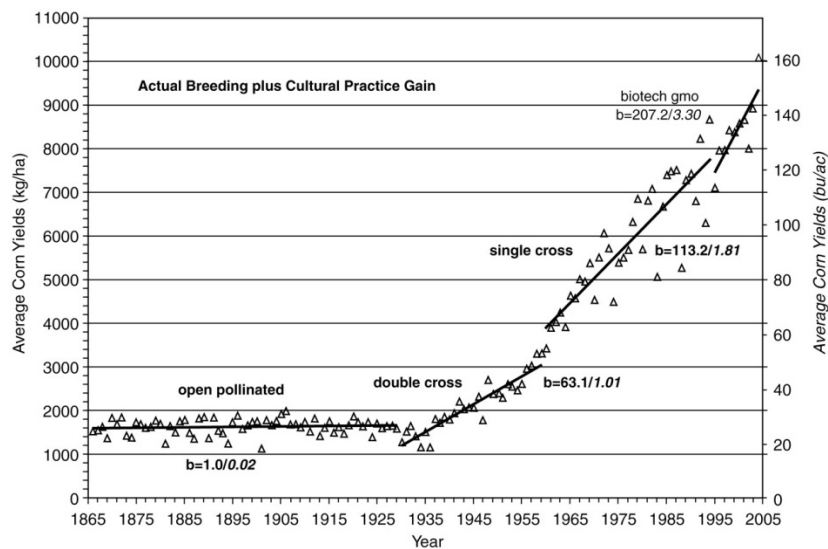


Figure 1-4 Rendement moyen des Etats-Unis pour le maïs, de la Guerre Civile à 2004. Les valeurs 'b' (régression $\text{kg}\cdot\text{bu}^{-1}$) indiquent le gain de production par unité de surface par année. Extrait de Troyer (2009).

l'initiative de la France et des grands semenciers, établit le droit de propriété intellectuelle de l'obteneur sur les semences qu'il vend à l'agriculteur, à travers le COV (Certificat d'Obtention Végétale). La *révolution verte* désigne la politique internationale de transformation des techniques agricoles, qui s'est traduite par un bond technologique en agriculture et en biologie végétale entre 1960 et 1990. En premier lieu, la popularisation du matériel militaire, a permis le développement d'outils agricoles motorisés, d'herbicides et de pesticides. L'agriculture traditionnelle évolua en agriculture intensive, où l'exploitation de plusieurs milliers d'hectares est alors réalisée par une poignée d'hommes. En parallèle, les techniques d'étude du vivant se développèrent considérablement, en lien avec les avancées en médecine comme la découverte de l'ADN dans les années 50. L'idée que la génétique serait le principal facteur déterminant pour le niveau de production agricole future, fut le moteur de la recherche scientifique de la *révolution verte*. La *révolution verte* est marquée par la création d'organismes de recherches internationaux toujours actifs, tels le CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo*) dans les années 60 ou le CGIAR (*Consultative Group on International Agricultural Research*) dans les années 70. Ces organismes de recherche sont financés par des organismes gouvernementaux ou internationaux, tels la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), ou des investisseurs comme les Fondations Rockefeller, Monsanto, ou Ford. Les espèces concernées par les recherches de ces organismes étaient les trois principales céréales cultivées dans le monde : le riz, le maïs et le blé. Les recherches menées par ces organismes et les semenciers privés (Pionner Hi-bred, Monsanto, Syngenta, etc.) furent concentrées sur l'obtention de variétés hybrides à haut rendement sélectionnées grâce aux développements des techniques moléculaires. Ces nouvelles variétés ont contribué à l'augmentation importante des rendements observée pendant la *révolution verte* (Fig. 1-4).

1.2.2. Aires de culture, productions et rendements

Le maïs avec 964 millions de tonnes produites en 2013, est la première production céréalière mondiale devant le blé (711 millions de tonnes) et le riz (470 millions de tonnes) (Fig. 1-5).

Le maïs est toujours majoritairement cultivé sur le continent américain, d'où il est originaire. La production du continent américain représente la moitié de la production mondiale avec plus de 480 millions de tonnes produites en 2013. L'essentiel de la production du continent Américain

2013/2014 Corn Production

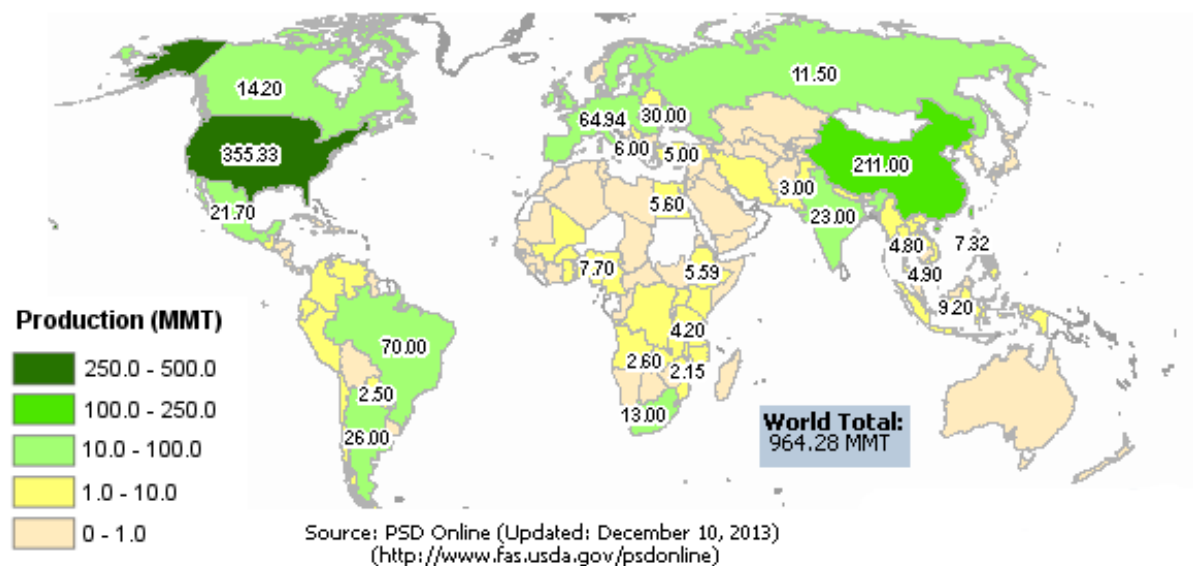


Figure 1-5 Production mondiale de maïs pour l'année 2013. (Source : USDA, 2013)

provient de la production des Etats-Unis avec 355 millions de tonnes en 2013. Le reste de la production du continent américain provient du Brésil (70 millions de tonnes), de l'Argentine (26 millions de tonnes), du Mexique (22 millions de tonnes) et du Canada (14 millions de tonnes).

L'Asie est ensuite le second continent producteur mondial de maïs avec 270 millions de tonnes en 2013. La production asiatique repose essentiellement sur la production de la Chine (211 millions de tonnes) et de l'Inde (23 millions de tonnes). L'Europe est le troisième producteur mondial avec 95 millions de tonnes, dont 65 millions de tonnes pour l'Union Européenne et 30 millions de tonnes pour l'Ukraine. L'Afrique produit 70 millions de tonnes et repose essentiellement sur la production de l'Afrique du Sud (13 millions de tonnes), du Nigéria (8 millions de tonnes) et de l'Egypte (6 millions de tonnes). Le reste de la production africaine est parsemé à travers les différents pays d'Afrique sub-saharienne. Enfin l'Océanie n'intervient presque pas dans la production mondiale de maïs avec moins d'un million de tonnes par an. (FAOSTAT-Janvier 2014).

Si l'on compare l'évolution de l'aire de culture à celle de la production, on constate que la surface de culture du maïs, bien qu'en évolution constante, évolue beaucoup moins vite que la progression de la production. La *révolution verte* a entraîné un gain de production important à l'échelle mondiale en améliorant constamment les rendements des *pays développés*, c'est-à-dire les États-Unis, l'Europe et l'Océanie (Australie), où une agriculture intensive et riche en intrants est réalisée. L'Asie, montre aussi une forte progression de son rendement (pente) similaire aux *pays développés*, mais avec un rendement plus faible illustrant sans doute le retard de l'Asie sur le développement de l'agriculture intensive, réalisé 20ans plus tard que dans les *pays développés*. Cependant l'Asie montre une évolution des rendements très importante depuis les années 60, illustrant sans doute la modification rapide de l'agriculture chinoise. L'Afrique possède aujourd'hui des rendements encore très faibles comparés aux autres continents. Bien que son rendement ait doublé en 50ans, l'Afrique montre des rendements similaires à l'Europe à la fin des années 50, avant le développement de l'agriculture moderne. Le retard de l'Afrique s'explique par une agriculture essentiellement artisanale, et par une instabilité politique récurrente qui inhibe probablement le développement de l'agriculture africaine.

1.2.3. Usage et consommation

Aujourd'hui, le maïs est la source alimentaire de base en Amérique Latine et en Afrique, où il est principalement consommé sous forme de galettes ou en bouillie. Dans les pays *développés*, le maïs est essentiellement utilisé pour l'alimentation animale et dans l'industrie agroalimentaire souvent comme liant ou sous forme de semoule, sa consommation comme légume (maïs doux) étant encore relativement marginale et en particulier en Europe. Par ailleurs le maïs est aussi utilisé dans l'industrie non alimentaire comme fibre, combustible, ou gélifiant grâce aux propriétés de l'amidon du maïs. Plus récemment deux nouvelles filières ont vu le jour, celle des biocarburants et celle des bioplastiques qui utilisent aussi le maïs comme matière première.

1.3. Botanique et biologie du maïs

1.3.1. Taxonomie

Le maïs (*Zea mays* ssp *mays*) est une monocotylédone de la famille des *Poaceae*, tout comme le riz, le blé, ou encore la canne à sucre. Cette famille regroupe environ 700 genres et 10 000 espèces réparties à travers tous les continents et regroupe des espèces essentielles pour l'alimentation humaine.

Les *Poaceae* se distinguent par des fleurs à périanthe (calice (= sépales) + corolle (= pétales)) réduit, composé uniquement de sépales. Les fleurs bisexuées ou unisexuées sont regroupées sous forme de racème simple (épi) ou composée (racème de racèmes qui forment une panicule). Les *Poaceae* sont essentiellement des plantes herbacées pérennes, mais présentent des cas de plantes annuelles tel le maïs, ou des plantes arborescentes comme le bambou. Les *Poaceae* se caractérisent aussi par la présence d'une gaine foliaire qui enserre la tige et d'une ligule membraneuse. Les *Poaceae* se caractérisent enfin par une accumulation de silicium dans les tissus, augmentant la rigidité des tissus et de la structure de la plante, rendant les feuilles des *Poaceae* coupantes.

Le maïs appartient à ce jour au genre *Zea* endémique du continent Américain et qui comprend 5 espèces de téosintes dont fait partie le maïs :



Figure 1-6. Différentes morphologies d'un plant de maïs. Extrait de Weatherwax (1923).

- *Zea mays* :
 - o *Zea mays* ssp *mays* (le maïs)
 - o *Zea mays* ssp *parviglumis*
 - o *Zea mays* ssp *mexicana*
 - o *Zea mays* ssp *huehuetenangensis*
- *Zea luxurians*
- *Zea nicaraguensis*
- *Zea diploperennis*
- *Zea perennis*

1.3.2. Description générale

Le maïs est une plante herbacée annuelle (monocarpique) monoïque dicline (les sexes séparés sur le même individu) de taille très variée, de 40cm à 6m, mais en général de 1 à 3 mètres pour les variétés cultivées (Fig. 1-6). Le maïs se caractérise par un développement monopodial, sans ou avec des ramifications basales qui forment des réitéras totaux ou partiels (réitération totale ou partielle de l'unité architecturale). Ce phénomène de réitération communément appelé « *tallage* » entraîne la formation de *talles*, et est observé lorsque la densité végétale est faible (ex : en bordure de champ).

Les feuilles se caractérisent par une gaine qui enserre la tige pouvant atteindre 20cm, une ligule membraneuse de quelques millimètres ; et un limbe linéaire à nervation parallèle, à marge lisse ou pubescente et apex acuminé. Le limbe peut atteindre 1m de long et 10cm de large. Les feuilles sont organisées selon une phyllotaxie alterne distique.

Le développement du méristème apical est défini, c'est-à-dire que le méristème met en place entre 10 à 20 feuilles selon les variétés, avant d'entamer le développement reproducteur. Le développement reproducteur se caractérise par l'initiation et le développement de l'inflorescence mâle (panicule) en position terminale sur l'axe, et par le développement d'une ou plusieurs inflorescences femelles (épis) en position axillaire le long de l'axe. L'initiation des épis a lieu durant le cycle végétatif, à l'aisselle de chaque feuille jusqu'à la feuille de l'épi supérieur, au-delà aucun épi n'est initié. En général, seul l'épi supérieur et quelques épis (1 ou 2) aux nœuds inférieurs se développent.

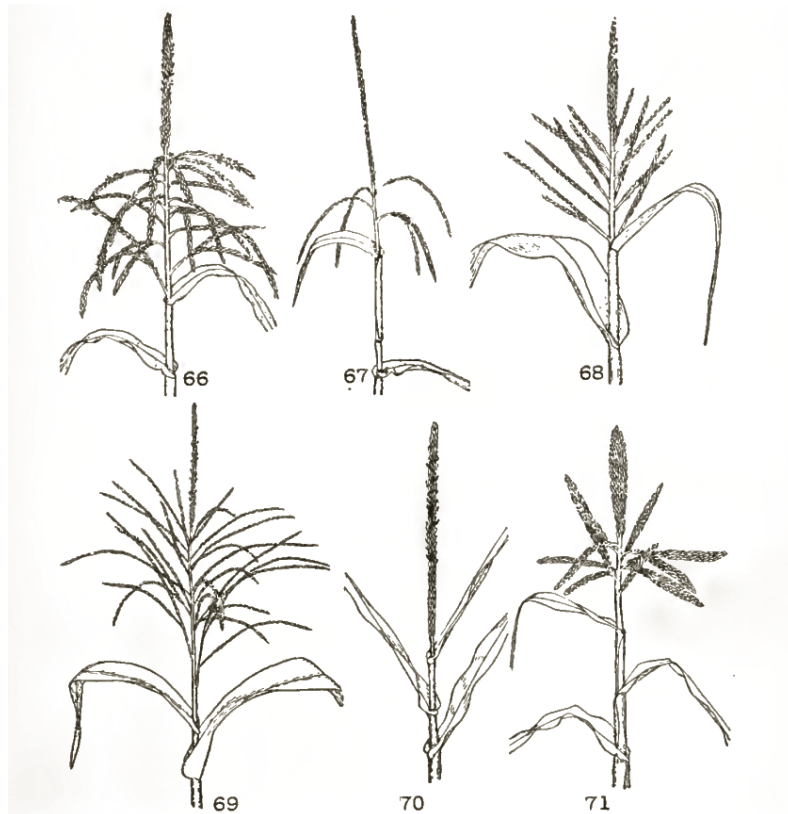


Figure 1-7. Différentes architectures de panicules de maïs. Extrait de Weatherwax (1923).

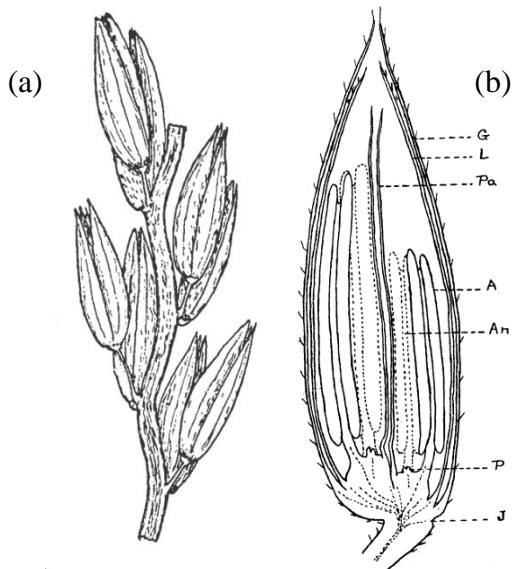


Figure 1-8. (a) Organisation des épillets mâles du maïs. (Extrait de Weatherwax, 1923). (b) Coupe longitudinale d'un épillet mâle de maïs. G, glume ; Pa, palea ; An, position de l'anthere latérale ; A , anthere dorsale ; L, lemme ; P, pistil rudimentaire ; J, jonction du rachis. Extrait de Weatherwax, (1916).

1.3.3. Morphologie des inflorescences

L'inflorescence mâle : la panicule

L'inflorescence mâle forme le plus souvent une inflorescence composée nommée *panicule*. Elle est composée d'un racème en position terminale et de plusieurs racèmes latéraux en position basale organisés en spirale. Le nombre de racèmes latéraux et le port des racèmes ou de la panicule (*érigé* ou *pleureur*) varient fortement avec les variétés (Fig. 1-7). Les racèmes portent enfin des épillets généralement organisés par paire. Les deux épillets sont apposés sur l'axe, ce qui permet de distinguer un épillet adaxial sessile d'un épillet abaxial pédicellé (Weatherwax, 1916).

Les épillets mâles sont généralement composés de deux fleurs entourées par deux bractées : les *glumes*. Ces deux fleurs caractéristiques des *Poaceae*, se distinguent par la présence d'un périanthe réduit à deux sépales : le *lemme* et le *palea*, d'une étamine (filet + anthère) et d'un pistil (ovaire + style + stigmate) rudimentaire. Le développement de l'appareil reproducteur femelle est avorté précocement (Fig. 1-8, Weatherwax, 1916).

L'inflorescence femelle : l'épi

L'axe (*pédoncule*) qui porte l'inflorescence femelle, a la même organisation que l'axe principal (tige), à la différence que son inflorescence est femelle ; et que l'élongation réduite de ses entre-nœuds permet aux gaines des feuilles de recouvrir l'épi jusqu'à maturité des grains. Ces feuilles modifiées sont nommées les *spathes* (Fig. 1-9, 1-10). Elles sont organisées en spirale le long du pédoncule et sont le plus souvent réduites à la gaine des feuilles, mais peuvent dans certaines conditions environnementales ou pour certaines variétés présenter un limbe et une ligule formant des spathes foliacées. A l'aisselle de chaque spathe se trouve un bourgeon qui peut se développer et donner une nouvelle inflorescence femelle distincte (pédoncule + spathes + épi). Tout comme l'axe principal de la panicule mâle, l'épi femelle est organisé sous forme d'un racème doublement composé, à la différence que les épillets et les fleurs y sont sessiles formant un *épi*, et que l'axe principal du racème est fortement lignifié formant un *rachis* ligneux. Les épillets femelles sont toujours mis en place par paire et formeront deux grains (1 grain par épillet), ce qui rend compte du fait qu'un épi a toujours un nombre pair de rangs autour du rachis, généralement entre 4 et 20 (jusqu'à 30) en fonction des variétés et de l'environnement. Chaque

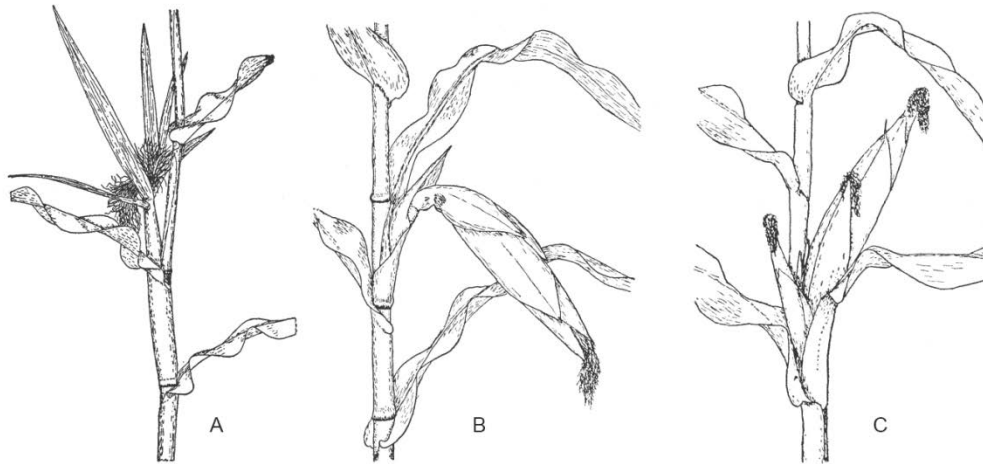


Figure 1-9. Différentes organisations des épis de maïs. (A) Epi avec des spathes foliacées. (B) Epi d'hybride de maïs denté. (C) Epi composé. Extrait de Weatherwax (1918).

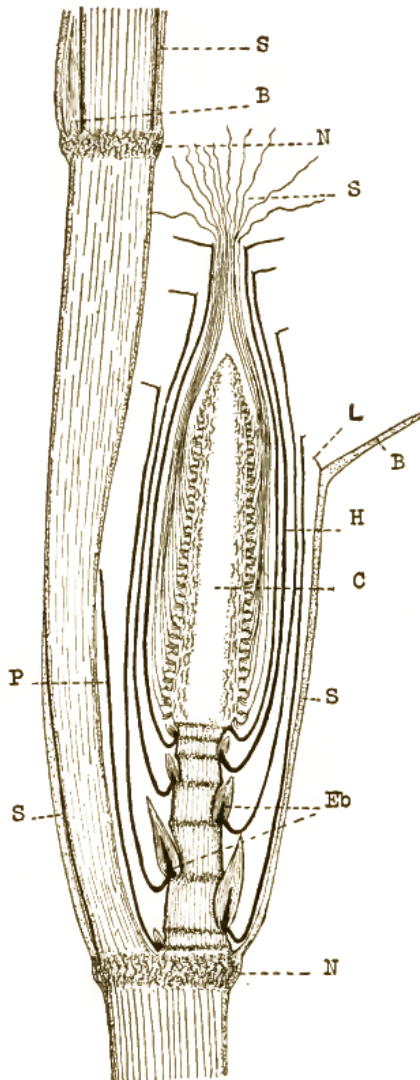


Figure 1-10. Coupe longitudinale d'un épi de maïs. S, gaine de la feuille ; B, bourgeon axillaire (épi non développé) ; N, nœud ; S, soies émergées au-delà des spathes ; L, ligule ; B, limbe des spathes ; H, spathes de l'épi ; C, rachis (cob) ; Eb, bourgeons d'épis secondaires ; P, prophyllum (bractée). Extrait de Weatherwax (1923).

épillet porte deux fleurs caractéristiques des *Poaceae* et présente la même structure que l'épillet mâle ; à la différence que la fleur basale (= fleur abaxiale de l'inflorescence mâle) et les étamines y sont avortées précocement. Les glumes restent rudimentaires au niveau de la fleur femelle sauf pour les variétés de maïs *vêtus* (*Zea mays ssp. mays var. tunicata*), où les glumes recouvrent l'ovaire puis le grain jusqu'à maturité (Weatherwax, 1916).

Le pistil du maïs est unicarpellé (1 ovaire à 1 ovule). Il se caractérise par un style rudimentaire et une élongation importante de son stigmate (en réalité deux stigmates soudés), qui peut atteindre une vingtaine de centimètres (Fig. 1-11). Ce stigmate allongé est communément nommé la *soie*, et sa forte élongation s'explique par le fait que le stigmate doit s'extraire des spathes afin de pouvoir recevoir le pollen.

Evolution des inflorescences à travers la domestication: comparaison des téosintes et du maïs

Le maïs cultivé et les téosintes montrent des fleurs similaires de par leur structure, mais présentent de fortes différences au niveau de l'organisation de leurs inflorescences, et en particulier de l'épi femelle. Les panicules mâles des téosintes sont en apparence semblables à celle du maïs, si ce n'est l'absence du racème principal et central, caractéristique du maïs. Les panicules mâles des téosintes sont donc formées uniquement de racèmes latéraux organisés en spirales (Weatherwax, 1918).

Chez les téosintes l'inflorescence femelle est formée généralement d'un épi simple cloisonné dans une seule spathe le plus souvent foliacée, mais avec limbe fortement réduit. A l'aisselle de la spathe se développe très souvent un nouvel épi, et ce phénomène se reproduit plusieurs fois formant des ramifications du quatrième ordre ou plus. L'ensemble de ces épis est enserré par la gaine de la feuille de la tige principale. L'épi des téosintes est formé initialement de 4 rangs d'épillets (2 paires d'épillets), mais pour chaque paire l'épillet adaxial (la plus proche de l'axe) avorte précocement, ne laissant que 2 rangs d'épillets fonctionnels (4 à 30 pour le maïs). Les épillets fonctionnels sont disposés selon une organisation alterne distique sur un rachis non ligneux difficilement perceptible. Comme chez le maïs les épillets des téosintes initient 2 fleurs dont l'une avorte précocement (Weatherwax, 1918).

Enfin pour les épis de téosintes les spathes sont beaucoup moins nombreuses et ne procurent pas la même protection que les spathes de maïs, laissant très souvent apparaître l'épi dès la floraison. La protection des ovaires est réalisée chez les téosintes par la glume extérieure qui se lignifie et protège l'ovaire, et le grain jusqu'à maturité. La taille des soies est aussi réduite chez les

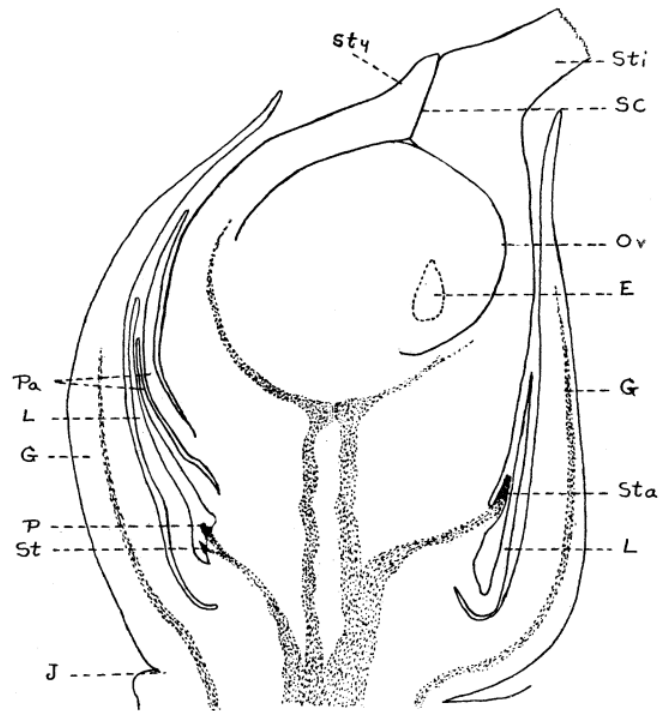


Figure 1-11. Coupe longitudinale d'un épillet femelle de maïs (x25). Sti, base de la soie ; Sty, style ; E , délimitation du sac embryonnaire ; L, lemme ; P, palea ; St, étamine de la fleur avortée ; SC, canal du style ; Ov, ovule ; G, glume ; Sta, étamine rudimentaire ; P, pistil de le fleur avortée ; J , jonction du rachis. Extrait de Weatherwax (1916).

téosintes, ce qui s'explique probablement par le fait que les spathes de téosinte sont beaucoup plus petites que celles du maïs, et donc que les soies de téosinte sont plus facilement au contact du pollen que les soies de maïs.

La domestication du maïs a fortement modifié l'organisation et le nombre d'épis femelles par plante (Brown *et al.*, 2011). Ces modifications passent probablement par une augmentation de la dominance apicale chez le maïs comparé aux téosintes. Le maïs est beaucoup moins ramifié que la téosinte au niveau de l'appareil végétatif, tout comme au niveau de l'appareil reproducteur. Chez ce dernier ce phénomène est particulièrement important, car les inflorescences sont essentiellement terminales chez le maïs, alors qu'elles sont essentiellement latérales chez les téosintes. Le nombre d'inflorescences s'en retrouve fortement réduit chez le maïs comparé aux téosintes. Le maïs concentre sa production de grains à un ou quelques épis qui fleurissent de façon quasi-synchrone, alors que les téosintes distribuent leur production de grains à travers un grand nombre d'épis qui fleurissent successivement en fonction de leur date d'initiation. La période de floraison des téosintes (quelques semaines) est donc beaucoup plus longue que celle du maïs (quelques jours) (Weatherwax, 1918).

1.3.4. Biologie

Biologie du développement végétatif et reproducteur

Le maïs est une céréale d'été cultivée entre mai et octobre dans l'hémisphère Nord, il est donc semé entre mi-avril et fin-mai. La phase végétative du maïs s'étend du semis à la floraison qui a lieu vers la mi-juillet. Pendant cette phase végétative le maïs passe tout d'abord par une phase hétérotrophe, c'est-à-dire que la plante dépend des ressources stockées dans la graine (amidon). Cette période est appelée la période de « sevrage », et perdure jusqu'à l'émission des premières feuilles. Une fois la période de sevrage passée, le maïs se caractérise par une croissance rapide pendant laquelle toute sa surface foliaire est initiée et mise en place. Cette croissance rapide nécessite des températures estivales (entre 20 et 30°C) et des apports en eau importants, probablement dus à l'origine tropicale du maïs.

A partir de l'initiation de la panicule mâle, le maïs entre dans sa phase reproductive qui se caractérise tout d'abord par l'élongation rapide de ses entre-nœuds, phénomène nommé la *montaison*. La montaison correspond aussi à la période de développement des fleurs et en

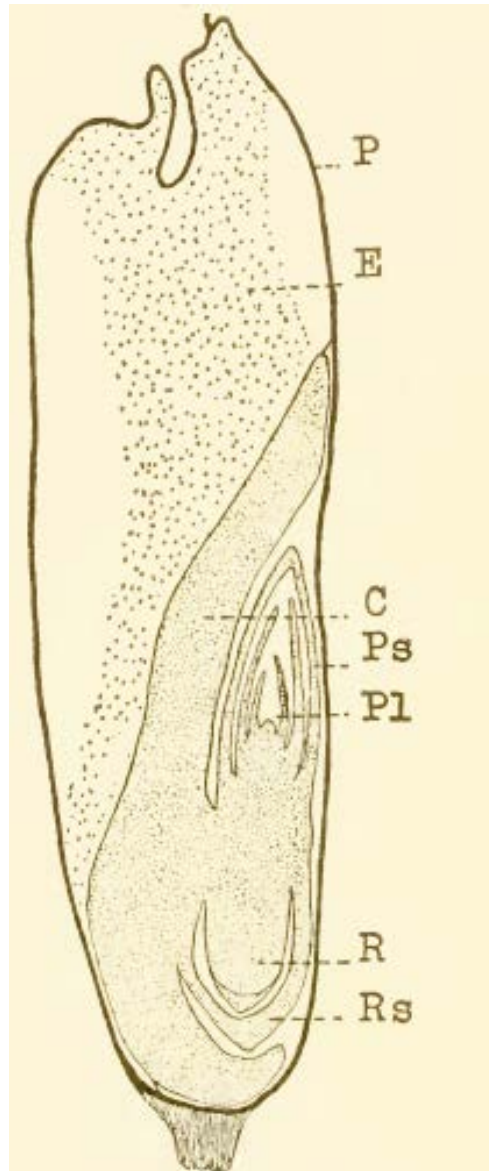


Figure 1-12. Coupe longitudinale d'un grain de maïs denté. P, péricarpe ; E, albumen ; C, cotylédon ; Ps, coléoptile ; Pl, plumule ; R, racine, Rs ; coléorhize. Extrait de Weatherwax (1923).

particulier des gamétophytes (le sac embryonnaire et le pollen). Une fois la montaison terminée débute la floraison du maïs, qui se caractérise en premier lieu par l'émergence et le déploiement de la panicule mâle encore immature. La panicule mâle est visible approximativement une semaine avant la dispersion du pollen (l'anthèse) et la floraison femelle : l'émergence des soies. Les épis femelles sont perceptibles une fois le phénomène de montaison totalement achevé pendant le déploiement de la panicule mâle. Les épis qui se développent sont les derniers initiés et ils se retrouvent en position médiane sur l'axe principal de la plante. Les premiers signes du développement d'un épi sont le *gonflement* de la gaine de la feuille qui l'axile ; suivi quelques jours après par l'apparition de l'extrémité des spathes au niveau de la ligule de la feuille qui l'axile. L'émergence des soies est alors imminente et a lieu généralement quelques jours ou quelques heures après l'apparition des spathes à la mi-juillet. L'émergence des soies est concomitante avec l'anthèse et a lieu quelques jours avant ou après en fonction des variétés et de l'environnement.

Biologie de reproduction

Le maïs est une plante anémogame et dépend uniquement du vent pour la dispersion du pollen. La capture du pollen se fait par les soies (stigmates) émergées des spathes au niveau de leurs trichomes. Une fois réceptionné par un trichome le grain de pollen se réhydrate, ce qui entraîne sa germination et la croissance du tube pollinique à travers les cellules de la soie jusqu'à l'ovule (Mól *et al.*, 2004; Kapu & Cosgrove, 2010). La croissance du tube pollinique dure plusieurs heures, entre 5 et 8h probablement en fonction de la longueur de la soie (Dupuis & Dumas, 1989). Une fois au niveau de l'ovule, le tube pollinique féconde l'ovule et le développement du grain de maïs débute. Le grain de maïs est un caryopse, c'est-à-dire un fruit sec indéhiscent dont la graine est intimement soudée au péricarpe (paroi de l'ovaire modifiée après la fécondation) par son tégument (Fig. 1-12). La graine est composée d'un albumen (endosperme triploïde) important et de l'embryon. Le développement du grain de maïs se caractérise essentiellement en fonction du développement de l'albumen où 3 phases sont distinguées. La première correspond à la période de différenciation des tissus de la graine durant laquelle la division cellulaire est prédominante. Cette phase dure environ 15 jours après la fécondation (Sabelli & Larkins, 2009). La seconde correspond à la phase de chargement du grain en assimilats carbonés et à la phase linéaire de croissance en biomasse du grain. Enfin la

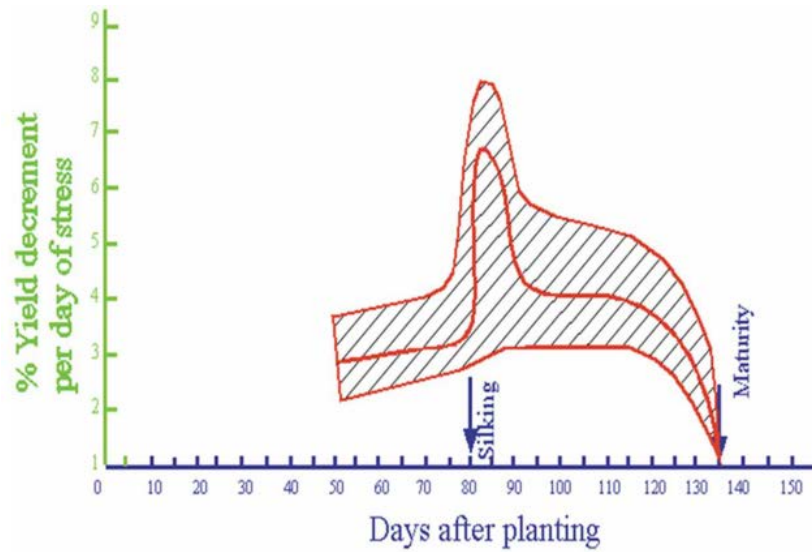


Figure 1-13. Relation entre les pertes de rendements par jour de stress et le stade de développement pour un hybride de maïs. Silking, émergence des soies. (Extrait de Araus *et al.*, 2012).

troisième phase correspond à la phase de maturité physiologique et se caractérise par la réduction de l'accumulation de biomasse et une teneur en eau réduite (Sala *et al.*, 2007). Le grain arrive généralement à maturité entre 50 et 60 jours après la fécondation.

1.4. Impact de la sécheresse à la floraison sur le rendement chez le maïs

La sécheresse est une importante cause de pertes de rendement chez le maïs, et les courtes périodes de sécheresse à la floraison sont les plus délétères (Fig. 1-13) (Denmead & Shaw, 1960; Claassen & Shaw, 1970; Grant *et al.*, 1989; Araus *et al.*, 2012). La période de sensibilité s'étend pendant toute la durée de la floraison, du développement des gamétophytes mâles et femelles avant la floraison, jusqu'au développement des jeunes grains avant la phase de chargement du grain. Pendant cette période le rendement est principalement réduit à travers une diminution du nombre de grains produits, alors que la biomasse des grains est mieux maintenue (Claassen & Shaw, 1970; Grant *et al.*, 1989; Otegui *et al.*, 1995).

Le maïs est une plante herbacée annuelle (monocarpique) monoïque dicline (les sexes sont séparés sur le même individu). Le développement reproducteur se caractérise par la mise en place d'une inflorescence mâle (la panicule) en position terminale et d'une inflorescence femelle en position axillaire, l'épi (Weatherwax, 1918 ; Fig. 1.3). Chez le maïs, au contraire du riz ou du blé, le développement reproducteur mâle et la viabilité du pollen sont peu affectés lors de périodes de sécheresse et ne rendent pas compte des pertes de rendement, comparés à l'appareil reproducteur femelle (Herrero & Johnson, 1981; Schoper *et al.*, 1986, 1987; Saini & Westgate, 1999; Boyer & Westgate, 2004). La viabilité de l'appareil reproducteur femelle dépend de la mise en place de plusieurs structures de façon successive, qui présentent chacune une sensibilité à la sécheresse pendant son développement. Ces structures sont i) l'ovaire et son ovule qui contient le sac embryonnaire et dont le rôle est d'assurer le développement de l'embryon et de l'albumen (réserve énergétique nécessaire à la germination hétérotrophe) après la fécondation; et ii) la soie (stigmates modifiés) dont le rôle est d'assurer la capture du grain de pollen et la croissance du tube pollinique jusqu'à l'ovaire. La sécheresse peut ainsi provoquer une réduction de la croissance des soies (Fuad-Hassan *et al.*, 2008) et l'avortement des ovaires avant les fécondations

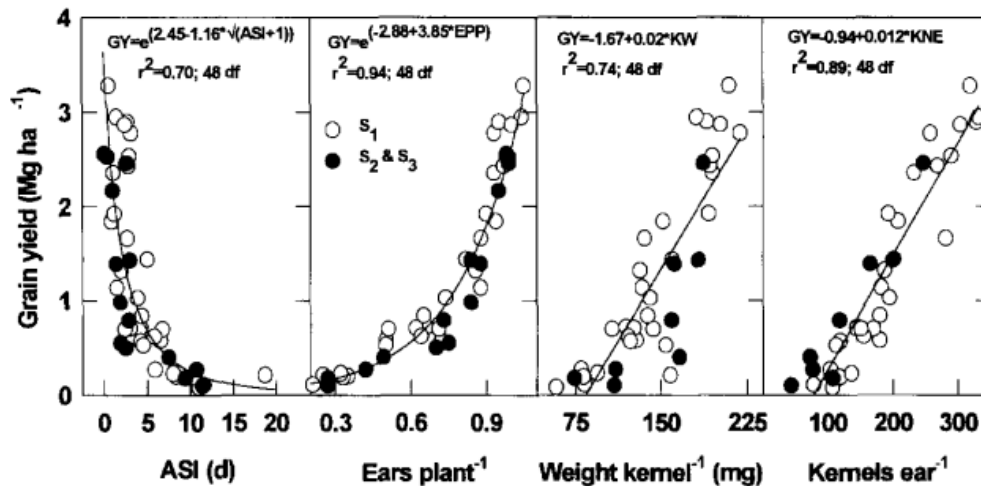


Figure 1-14. Le rendement en grain en fonction de la moyenne de l'*anthesis-silking interval* (ASI), du nombre d'épi.plante⁻¹, de la masse par grain, et du nombre de grains.plante⁻¹ pour 50 lignées provenant de 6 populations de maïs tropical sous une gamme de régimes hydriques à Tlaltizapán, Mexique, 1986-1990. Chaque point est la moyenne d'un essai. (Extrait de Bolaños & Edmeades, 1996).



Figure 1-15. Epis de maïs montrant un avortement apical après une période de sécheresse à la floraison. (Extrait de www.pioneer.com/home/site/mobile/grow/corn/pollination-success/, avril 2014).

(Moss & Downey, 1971), ou pendant le développement précoce de l'embryon (Boyer & Westgate, 2004).

La sécheresse diminue par définition la quantité d'eau disponible pour la plante, si la demande de la plante (transpiration) est plus importante que l'offre (captation racinaire), un déficit hydrique est alors défini comme le déséquilibre entre la disponibilité de l'eau dans le sol et la demande évaporative de l'air. Un déficit hydrique provoque généralement un retard de l'émergence des soies hors des spathes (Fuad-Hassan *et al.*, 2008), qui génère un décalage entre les floraisons mâle et femelle (*Anthesis-Silking Interval* : ASI). Ce décalage est proche de zéro, voire négatif, chez les plantes bien irriguées (Fig. 1-14, Edmeades *et al.*, 1993). Lorsque le déficit hydrique est accompagné d'un fort ASI, les pertes de rendement observées sont le plus souvent attribuées à une réduction de la disponibilité en pollen (Edmeades *et al.*, 2000), et des avortements apicaux sont relatés par les producteurs (Fig. 1-15, Pioneer.com, avril 2014). L'impact des déficits hydriques sur le développement et l'émergence des soies est rarement discuté. Schussler & Westgate (1994) relatent une réduction de 20% du nombre de soies émergées 4 jours après la première émergence, avec un déficit hydrique de 4 jours ressenti 2 jours avant la floraison. La perturbation de la floraison et de la fécondation à travers le processus d'émergence des soies pourrait donc être une cause importante des pertes de rendement lors de sécheresses (Herrero & Johnson, 1981), car la croissance des soies est hautement sensible au déficit hydrique modéré et de courte durée (Fuad-Hassan *et al.*, 2008). Ainsi, l'émergence de la totalité des soies d'un épi peut être perturbée sous déficit hydrique, ou du moins ce processus peut être ralenti. Comme l'initiation des ovaires le long de l'épi à lieu séquentiellement de la base à l'apex de l'épi, les soies portées par les ovaires apicaux qui avortent sont les plus jeunes (Cárcova *et al.*, 2003). Ces observations indiquent un lien entre développement et avortement. Mais quelle est la chronologie des événements qui mène à l'avortement ? L'émergence des soies est-elle directement réduite par l'avortement de l'ovaire, ou est-elle la simple résultante de la vitesse de croissance des soies ? A quel point l'émergence des soies est-elle responsable de la production de l'épi ? Cette thèse se propose de répondre à ces premières questions et d'éclaircir le rôle de l'émergence des soies dans le mécanisme de reproduction du maïs.

Deux hypothèses peuvent expliquer l'avortement des ovaires ou jeunes grains observé lors de sécheresse. La première repose sur la réduction de la photosynthèse de la plante pendant

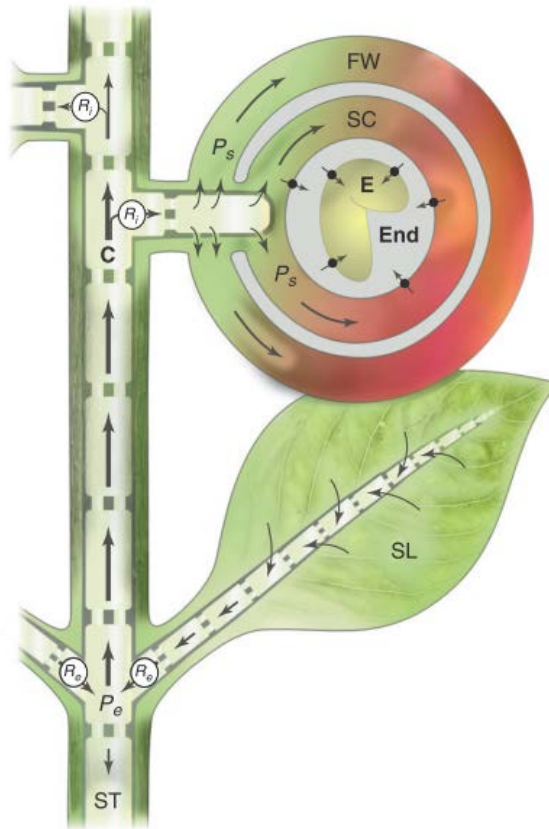


Figure 1-16. Transport des assimilats carbonés vers les fruits et les graines en développement. Les assimilats carbonés sont chargés (flèches incurvées dans la feuille) dans les tubes criblés du phloème (ST) au niveau des feuilles sources (SL) en fonction du taux d'exportation (R_e) et de la concentration du phloème (C). Ils suivent le flux du phloème (flèches droites) pilotés par la différence de pression hydrostatique générée par les feuilles sources (P_e) et les puits (P_s). Une portion de la sève élaborée est importée dans les tissus maternels des fruits et des graines (FW : paroi, SC : tégument) en fonction d'un taux d'importation (R_i) défini par le flux de sève élaborée qui passe à travers les plasmodesmes (flèches incurvées dans le fruit) entre les tubes criblés et les cellules non-vasculaires. Les transporteurs membranaires (cercles) facilitent le transport des assimilats carbonés (flèches qui traversent des cercles) des tissus maternels (SC) vers l'albumen (End) et l'embryon (E). (Extrait de Ruan *et al.* 2012).

le déficit hydrique, et le rôle du métabolisme carboné dans le développement du grain (Fig. 1-16, Ruan *et al.*, 2012). La seconde, repose sur la réduction de la croissance des soies et la perturbation du bon déroulement des fécondations générées par le déficit hydrique. En vue de l'amélioration de la tolérance à la sécheresse de la floraison du maïs il est désormais essentiel de comprendre les événements qui mènent aux pertes de rendement pour l'identification et la hiérarchisation du ou des leviers d'actions prioritaires de l'amélioration variétale, l'hydraulique et/ou l'assimilation carbonée de la plante (Tardieu *et al.*, 2011). Par ailleurs dans le contexte actuel des analyses à haut débit (génotypage, phénotypage, et phénotypage) qui se concentrent sur l'analyse de quelques traits sur des centaines d'individus, il est important d'identifier les processus impliqués dans l'avortement pour la proposition de traits fonctionnels ou phénotypiques pertinents et la définition des méthodologies de phénotypage, c'est-à-dire de préciser ce qu'il faut mesurer, quand et comment.

1.5. L'avortement des grains de maïs lors de déficit hydrique est-il fonction de l'assimilation carbonée ?

L'hypothèse de la détermination du nombre de grains par l'assimilation carbonée de la plante (photosynthèse) est illustrée par le rétablissement partiel du nombre de grains à l'aide de perfusion de saccharose (produit de la photosynthèse) lors de déficits hydriques sévères, où la photosynthèse et le statut hydrique de la plante sont fortement diminués (Boyle *et al.*, 1991a; Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999; Mäkelä *et al.*, 2005). Dans ces conditions le flux réduit de saccharose vers les ovaires en déficit hydrique (Mäkelä *et al.*, 2005) coïncide avec une réduction de l'activité des invertases acides pariétales et vacuolaires (Zinselmeier *et al.*, 1995c, 1999; McLaughlin & Boyer, 2004). L'activité des invertases - enzymes dont le rôle est de cliver le saccharose (sucrose) en une molécule de glucose et une molécule de fructose - serait alors limitée par la synthèse réduite de saccharose lors de déficit hydrique (McLaughlin & Boyer, 2004). Les invertases peuvent être pariétale (*cell-wall invertase* : CWI), cytosolique/pastidiale (*neutral invertase* : NI) ou vacuolaire (*vacuolar invertase* : VI), et ces enzymes ont différents rôles en fonction de leur localisation cellulaire ou tissulaire (Sturm, 1999; Sturm & Tang, 1999; Roitsch & González, 2004). Les invertases pariétales apparaissent impliqués dans la régulation de l'allocation en saccharose, la réponse aux pathogènes ou aux lésions tissulaires, et le développement du pollen et des grains. Les invertases vacuolaires apparaissent impliqués dans

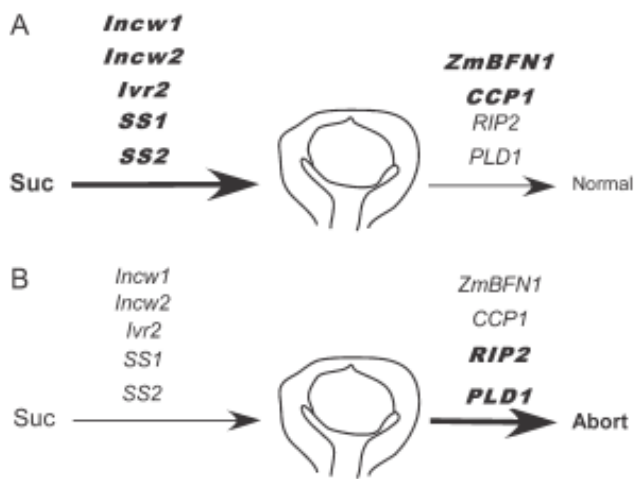


Figure 1-17. Résumé de l'expression des gènes dans des ovaires de maïs en développement (A) ou en cours d'avortement (B). L'entrée de saccharose (Suc, sucrose) détermine la disponibilité en carbone des ovaires. Si l'entrée de saccharose est réduite les ovaires peuvent avorter. Le niveau d'expression des gènes est montré en italique, indiquant les forts (en gras) et les faibles (en police régulière) niveaux d'expression. L'eau est disponible en (A), et tous les gènes exceptés *RIP2* et *PLD1*, montrent des forts niveaux d'expression. Les ovaires normaux croissent rapidement (Normal). Durant une contrainte hydrique qui diminue le flux de saccharose aux ovaires autour de la période de pollinisation (B), tous les gènes liés au saccharose sont sous-exprimés, et les gènes *ZmBFN1* et *CCP1* montrent une sous-expression similaire. Au contraire *RIP2* et *PLD1* montrent dans ces conditions une surexpression, suggérant une possible implication de ces gènes dans l'arrêt irréversible du développement des ovaires, et les ovaires avortent (Abort). (Extrait de Boyer & McLaughlin, 2007).

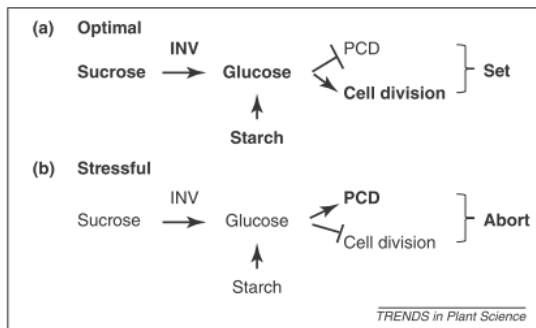


Figure 1-18. Modèle de la régulation du nombre de graines ou de fruits à travers la voie de signalisation des sucres. (a) Sous conditions optimales, le saccharose (Sucrose) venant du phloème est hydrolysé par les invertases (INV) dans les ovaires et les ovules. Le glucose qui en résulte est considéré comme un signal qui inhibe les gènes de la *mort cellulaire programmée* (*Programmed Cell Death*, PCD) et stimule la division cellulaire. Ce mécanisme détermine le nombre de graines (Set). Les réserves carbonées sous forme d'amidon (Starch) peuvent être remobilisées pour la production de glucose supplémentaire, en particulier lors de déficit hydrique modéré. (b) Sous des déficits hydrique sévères, l'importation du saccharose venant du phloème est inhibée, entraînant une réduction de l'activité des invertases. Ce mécanisme couplé à l'épuisement des réserves en amidon, réduit les concentrations en glucose, ce qui active la PCD et inhibe la division cellulaire. En conséquence, la graine ou le fruit avorte. (Extrait de Ruan *et al.*, 2012).

le processus d'ajustement osmotique et interviennent plus particulièrement dans les processus d'expansion cellulaire et la réponse aux déficits hydriques. Les invertases neutres interviennent dans les processus du développement cellulaire et reproducteur, la réponse aux stress oxydatifs, ainsi que dans la voie de signalisation des sucres (Qi *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011). L'activité des invertases et en particulier des invertases pariétales est alors considérée comme un senseur de la disponibilité en saccharose et comme un élément important de la voie de signalisation des sucres (Fig. 1-17 et 1-18, Boyer & McLaughlin, 2007; Ruan *et al.*, 2012). Chez le maïs, l'avortement des ovaires et des jeunes grains est attribué à une réduction de l'activité de l'invertase pariétale en déficit hydrique qui coïncide avec l'augmentation des transcrits de gènes reliés à la sénescence (McLaughlin & Boyer, 2004; Boyer & McLaughlin, 2007). L'activité de l'invertase pariétale est donc proposée comme un senseur de l'état carboné de la plante qui détermine l'avortement des ovaires en fonction du flux de saccharose vers ces derniers (Boyer & McLaughlin, 2007; Ruan *et al.*, 2012). Cette conclusion est basée sur le fait qu'une perfusion de saccharose permet le maintien de concentrations en saccharose élevées dans les ovaires lors de déficit hydrique et une réduction de l'avortement (Fig. 1-19, Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999).

Cependant le mutant *miniature-1* qui montre une perte de fonction totale de l'invertase pariétale (*Incw2*) développe des grains de petites tailles, mais ne montre pas plus d'avortement que son homologue non muté (Miller & Chourey, 1992; Cheng & Chourey, 1999; LeClere *et al.*, 2010). L'activité de l'invertase pariétale (*Incw2*) est proposée par certains auteurs non plus comme un marqueur de l'avortement, mais comme un marqueur du développement du grain car celle-ci apparait essentiel pour les divisions cellulaires du développement précoce de l'albumen (Cheng & Chourey, 1999). La réduction de l'activité ou de l'expression de l'invertase pariétale dans les ovaires avortés serait alors le résultat de l'avortement et non la cause. L'avortement pourrait être le résultat de la non-pollinisation des ovaires et d'une perturbation du développement de l'épi (Qin *et al.*, 2004). Le rôle de l'invertase pariétale dans l'avortement des ovaires reste donc incertain et à démontrer. A ceci vient s'ajouter le fait que les expériences d'ombrage pendant la floraison ne montrent souvent pas d'effet significatif sur le nombre de grains, alors même que la photosynthèse de la plante entière est totalement inhibée (Fig. 1-20, Schussler & Westgate, 1994, 1995; Zinselmeier *et al.*, 1995b; Hiyane *et al.*, 2010). A l'opposé, plusieurs auteurs relatent des avortements en déficit hydrique alors que la teneur en saccharose des ovaires n'est pas limitante (Setter *et al.*, 2001 en serre ; Andersen *et al.*, 2002 au champ). Les

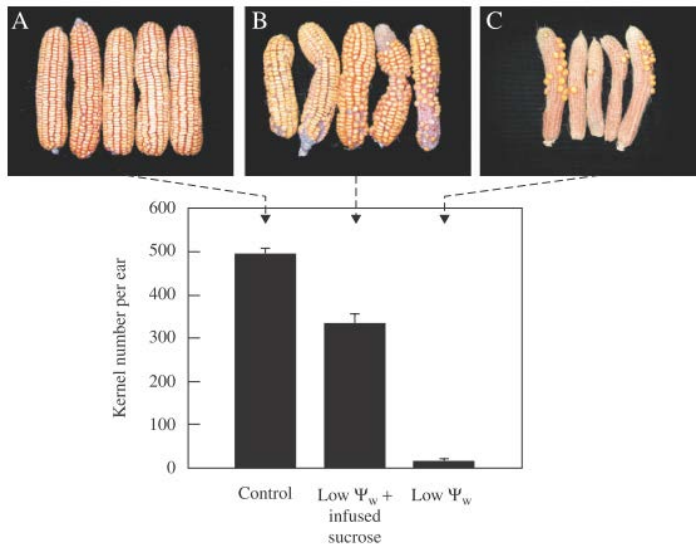


Figure 1-19. Effet d'un déficit hydrique sévère (photosynthèse nulle) et d'une perfusion de saccharose autour de la pollinisation sur le nombre de grains par épi. (A) Epis contrôles bien irrigués, (B) épis sous déficit hydrique + perfusion de saccharose au niveau de la tige, (C) épis sous déficit hydrique. Histogramme, indique les moyennes + l'erreur standard pour 9-11 plantes. Extrait de McLaughlin & Boyer (2004).

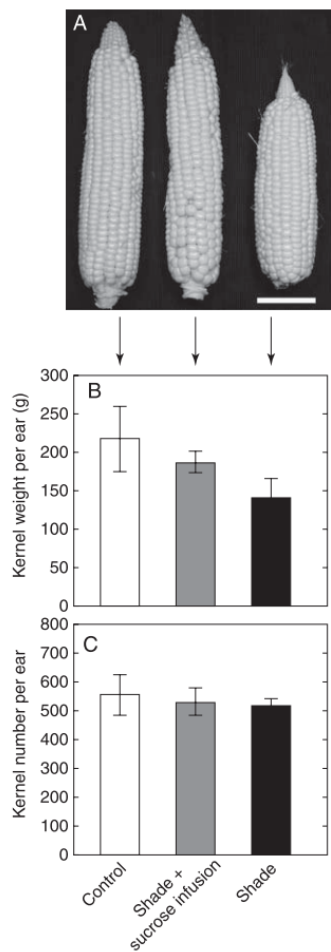


Figure 1-20. Effet d'un ombrage et d'une perfusion de saccharose sur (A) le développement de l'épi, (B) la biomasse des grains, et (C) le nombre de grains par épi. Control, épi contrôle non-ombré ; Shade + sucrose infusion, épi sous ombrage et perfusion de saccharose ; Shade, épi sous ombrage. Les données sont les moyennes + l'erreur standard (n=4). Echelle = 5 cm. Extrait de Hiyane *et al.* (2010).

études qui analysent les effets des perfusions de saccharose ne discutent pas de la viabilité de la soie, ni même du nombre de soies émergées après plusieurs jours de déficit hydrique, ce qui ne permet pas d'apprécier l'impact de ces phénomènes sur la mise en place du nombre de grains sous déficit hydrique. Les expériences de Boyle *et al.* (1991) et les suivantes se caractérisent par des contraintes hydriques très sévères et par une pollinisation synchrone des soies plusieurs jours après leur émergence et l'application de la contrainte hydrique (Boyle *et al.*, 1991; Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999; Setter *et al.*, 2001; McLaughlin & Boyer, 2004; Mäkelä *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces éléments font que nous avons considéré utile que cette thèse revisite le postulat, généralement admis, qui relie l'assimilation carbonée de la plante au déterminisme du nombre de grains lors de déficit hydrique à la floraison.

1.6. Rôle de la dynamique de floraison du maïs sur le déterminisme du nombre de grains

1.6.1. Effet du synchronisme des floraisons mâle et femelle et de la cinétique de pollinisation des ovaires le long de l'épi

L'effet récurrent des déficits hydriques pendant la floraison est l'augmentation de l'ASI, souvent corrélée aux pertes de rendement (Bassetti & Westgate, 1994; Edmeades *et al.*, 2000). La sélection variétale basée sur le maintien d'un ASI court lors de sécheresse, a permis un meilleur maintien des rendements (Bolaños & Edmeades, 1993; Campos *et al.*, 2004). Comme l'émergence des soies a lieu successivement le long de l'épi de maïs de la base à l'apex, un décalage de l'ASI pourrait se traduire par la non-fécondation des dernières soies émergées par l'absence de pollen (Bassetti & Westgate, 1994). La perte de grains est alors principalement observée sur la partie apicale des épis qui correspond aux ovaires les plus jeunes dont le développement est le moins avancé (Fig. 1-21, Bassetti & Westgate, 1994; Cárcova *et al.*, 2003). Cette observation suggère un lien entre l'état de développement des ovaires et leur avortement, ou plus précisément entre l'état de développement des soies et l'avortement, suggérant que la perte de grains résulte d'une diminution de la disponibilité en pollen lorsque la floraison femelle est fortement décalée par rapport à la floraison mâle.

L'avortement des ovaires apicaux, est aussi observé pour des plantes bien irriguées indépendamment de la disponibilité en pollen. Ce phénomène est quasiment supprimé lorsque

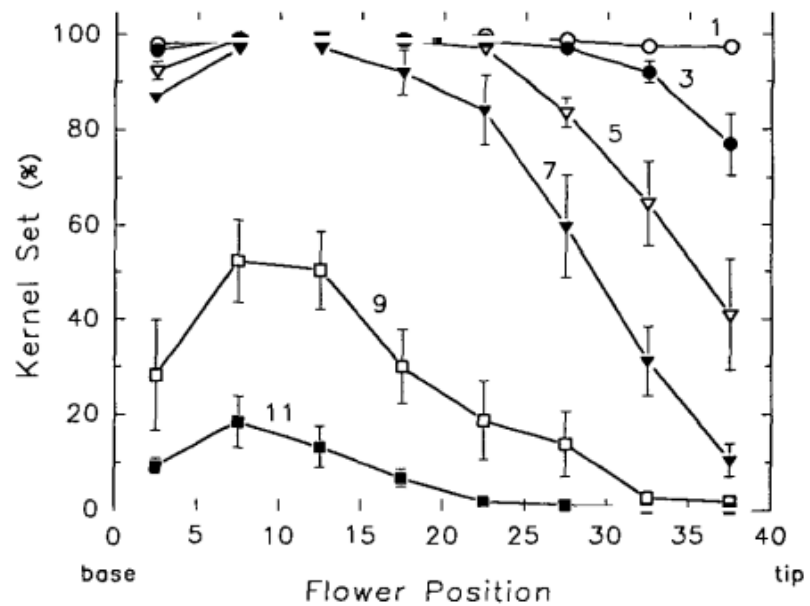


Figure 1-21. Effet de l'asynchronisme entre l'émergence des soies et 50% de l'anthèse sur le nombre de grains en fonction de la position des ovaires sur l'épi. Les nombres indiquent les jours entre la première émergence de soies et 50% de l'anthèse des plantes de bordure. *Kernel Set*, nombre de grains produits ; moyenne de 5 positions consécutives d'ovaires le long de l'épi, de la base (base) à l'apex (tip). Les données sont les moyennes \pm l'erreur standard pour 8-12 épis prélevés sur des plantes émasculées. Extrait de Bassetti & Westage (1994).

l'ensemble des soies d'un épi est pollinisée artificiellement de façon synchrone à la fin de l'émergence des soies (5 jours après début de l'émergence) (Cárcova *et al.*, 2000; Cárcova & Otegui, 2001; Uribebarrea *et al.*, 2008). Au contraire, les expériences de pollinisation asynchrone ont montré que la durée de réceptivité de l'épi était directement conditionnée par la date des premières fécondations le long de l'épi (Cárcova & Otegui, 2001). Ainsi, si un décalage artificiel est appliqué entre la pollinisation des premières soies émergées et celle des soies émergées plus tardivement, les ovaires dont la fécondation a été retardée de 6 jours ne développent pas de grains en position apicale, indépendamment des états hydrique ou carboné de la plante.

Ces deux résultats combinés suggèrent que, chez le maïs, une période de réceptivité existe qui définit le compromis entre le nombre de grains produit et la biomasse des grains (Uribebarrea *et al.*, 2008). Les premières fécondations semblent déclencher un « compte-à-rebours » dont l'échéance détermine la fin de la période de réceptivité de l'épi. La période de réceptivité de l'épi apparaît de 4 à 5 jours après les premières fécondations au vu des résultats des pollinisations synchrones.

Nous proposons donc l'hypothèse que la détermination du nombre de grains par la plante est le résultat de sa capacité à féconder rapidement (de façon quasi-synchrone) ses ovaires. Ce mécanisme dépend probablement de la vitesse d'exposition des soies de l'épi.

1.6.2. Effet du déficit hydrique sur la dynamique de floraison du maïs

L'émergence des soies est un processus séquentiel, qui reflète à la fois l'état de développement et la position de l'ovaire sur l'épi (Bassetti & Westgate, 1994; Cárcova *et al.*, 2003). Les premières soies émergées sont en position basale de l'épi, les dernières en position apicale. Cependant, les soies des ovaires les plus basaux émergent après celles des 5-15 premiers étages de l'épi à partir de la base, puis l'ensemble des soies des ovaires plus apicaux émergent séquentiellement en suivant le gradient de développement le long de l'épi (Fig. 1-22, Bassetti & Westgate, 1994; Cárcova *et al.*, 2003). L'émergence des soies s'étend sur 8-16 jours en fonction des génotypes et de l'environnement (Cárcova & Otegui, 2001; Uribebarrea *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004). A notre connaissance, la dynamique d'émergence des soies du maïs n'a encore jamais été caractérisée lors de déficit hydrique. Cependant l'allongement de l'ASI suggère

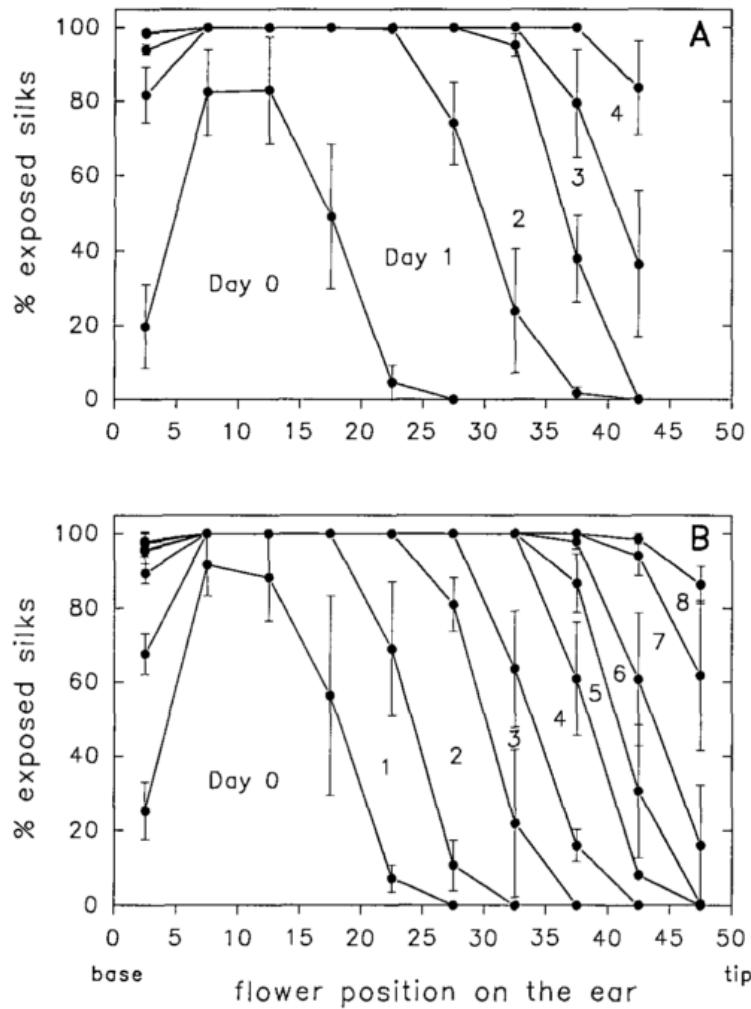


Figure 1-22. Timing d'émergence des soies en fonction des différentes positions le long de l'épi. (A) hybride 1 (B) hybride 2. Day 0, est le jour de la première émergence de soies. Les données sont les moyennes de 5 positions d'ovaires consécutives le long de l'épi \pm l'erreur standard pour 3-5 épis. Extrait de Bassetti & Westgate (1993a).

une perturbation du mécanisme de reproduction par la contrainte hydrique (Herrero & Johnson, 1981; Schoper *et al.*, 1986).

L'ensemble de ces éléments nous amène à penser que la réduction du nombre de grains lors de déficit hydrique à la floraison est sans doute la résultante de plusieurs éléments :

- l'ampleur de l'ASI qui définit la disponibilité en pollen,
- la date des premières fécondations qui déclenche le « compte-à-rebours » avant la fin de réceptivité de l'épi,
- et la vitesse d'émergence des premières soies qui définit le nombre de fécondations possibles durant la réceptivité de l'épi.

Ces caractères dépendent principalement de l'élongation de la soie. La sensibilité de la croissance des soies aux déficits hydriques pourrait ainsi expliquer la sensibilité à l'avortement.

1.7. Démarche expérimentale

Ce travail de thèse se propose de clarifier les rôles respectifs de l'émergence des soies et du métabolisme carboné dans les pertes de grains observées lors de déficit hydrique à la floraison. L'objectif est d'identifier les leviers d'action potentiels de la sélection variétale pour l'amélioration de la tolérance du maïs à la sécheresse. En particulier est-ce le maintien de la photosynthèse, ou le maintien de l'hydraulique de la plante qui est déterminant ? Nous avons cherché à hiérarchiser l'ensemble des résultats disponibles dans la littérature, pour que l'histoire de chacun ne fasse qu'une seule et même histoire synthétique.

1.7.1. Test de l'hypothèse basée sur la dynamique de floraison femelle et identification du meilleur prédicteur du rendement : l'ovaire ou sa soie

Le premier objectif de la thèse a donc été de rendre compte de l'impact des déficits hydriques sur la dynamique d'émergence des soies. Pour cela, plusieurs expériences ont été réalisées avec des déficits hydriques de différentes intensités appliqués sur la même période, depuis l'émergence de la panicule jusque 8 jours après l'émergence des soies. L'intensité des déficits hydriques a été choisie pour rendre compte de ceux observés au champ, où le nombre de

grains produits est le plus souvent partiellement réduit lors d'un déficit hydrique. Les déficits au champ sont en général modérés par rapport à ceux imposés dans des expériences en pots.

La première expérience avait pour objectif de rendre compte du nombre de soies émergées via le développement des ovaires, en fonction du temps et de 3 traitements hydriques qui balaient la gamme de production du maïs. La deuxième expérience a fourni une première estimation de l'impact de la variabilité génétique sur ce processus. Une expérience de fécondation synchrone ou asynchrone a permis de comparer nos résultats à ceux de la littérature.

1.7.2. Test de l'hypothèse d'une carence carbonée : caractérisation des évènements métaboliques et développementaux qui mènent à l'avortement de l'ovaire

Le second travail de cette thèse a été d'observer et de comparer l'évolution du métabolisme carboné des différents d'organes essentiels à la reproduction (feuilles, pédoncule, rachis, ovaires et soies) afin d'établir la chronologie des évènements qui mènent aux pertes de grains lors d'un déficit hydrique modéré. Pour cela les concentrations en sucres solubles et en amidon, ainsi que l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme carboné ont été mesurées à 3 stades de développement de l'épi dans les feuilles et les différents organes de l'épi, en particulier les ovaires basaux (qui n'avortent pas) et apicaux (qui avortent en déficit hydrique). Un transcriptome a également été réalisé sur ces deux catégories d'ovaires. A la différence des travaux déjà publiés sur le métabolisme des ovaires, le déficit hydrique utilisé était modéré avec un maintien partiel de la photosynthèse et la pollinisation était réalisée séquentiellement en fonction de l'émergence des soies.

Chapitre 2 : The sequential development of silks is a major cause of ovary abortion in maize under water deficit

Vincent Oury¹, François Tardieu¹, Olivier Turc¹

¹ INRA, UMR759 Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux.
Place Viala, F-34060 Montpellier, France

Soumis à New Phytologist

Summary

- Grain abortion allows production of at least few viable seeds under water deficit, but causes major yield loss. We have tested its link to the differential development of ovary cohorts and to the timing of maize silk emergence.
- Ovary volume and silk growth were followed from 3 days before silk emergence to 23 days after it, under four levels of water deficit and four hybrids in two experiments. Experiments with synchronous or asynchronous pollination were also performed.
- Cohorts of ovules developed sequentially from ear base to apex. Silk growth decreased in water deficit and stopped slightly after first silk emergence, thereby limiting the number of emerged silks. Final grain number was accounted for by the number of emerged silks across treatments and genotypes. Hence, a first switch to abortion occurred at silk emergence, which determined grain number when pollination was synchronous for all ovaries, either artificially or in water deficit. Asynchronous pollination, occurring artificially or when plants were rewatered during silk emergence, caused another switch to abortion.
- These two causes of abortion probably represent the major proportion of aborted grains in most drought scenarios in the field. They occur before the classically described abortion due to carbon deprivation in ovaries.

Key words: Abortion, water deficit, development, ovary, silk, grain, spatial analysis, maize

Introduction

Breeding for drought tolerance has led to a massive increase in maize yields under water deficit over the last 50 years (Cooper *et al.*, 2009; Lobell *et al.*, 2014), associated with a decrease in the Anthesis-Silking Interval (ASI, Bolaños & Edmeades, 1996; Chapman & Edmeades, 1999; Duvick, 2005). The latter is the time elapsing from the beginning of anther dehiscence (male flowering) to the emergence of stigmates (silks) over the modified leaf sheaths (husks) that enclose the female inflorescence, the ear (Weatherwax, 1916). Silk emergence is the phenological stage with a maximum sensitivity to water deficit (Denmead & Shaw, 1960; Grant *et al.*, 1989; Araus *et al.*, 2012), although this maximum may have shifted towards slightly earlier stages in modern genotypes (Bruce *et al.*, 2002). An irreversible arrest of ovary development is observed when water deficit is imposed at this time, resulting in ovary/grain abortion, even when viable pollen is provided to silks (Boyer & Westgate, 2004).

The causal link between silk development and ovary abortion is not clearly understood. It has been proposed that an increased ASI under water deficit is due to a decreased assimilate flux towards the ear. In this view, ASI would be a symptom of decreased assimilate partitioning to the developing spikelets (Edmeades *et al.*, 1993, 2000) rather than directly involved in abortion. This would be in line with a series of studies suggesting that sugar deprivation is the major cause of ovary abortion (Boyle *et al.*, 1991; Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999; McLaughlin & Boyer, 2004). However, a companion paper (Oury *et al.*, submitted) suggests that a moderate water deficit, with an intensity similar to those observed in the field, causes a large ovary abortion in spite of a maintained or even improved carbon status in ovaries and whole-plant, characterised by photosynthesis, concentrations/amounts of sugars, enzyme activities and transcript abundances. This is consistent with recent studies showing that moderate water deficits can induce an accumulation of carbohydrates (Hummel *et al.*, 2010; Pantin *et al.*, 2013).

In the absence of water deficit, the timing of pollination can cause the abortion of ovaries located near the ear apex without affecting those at the ear base. The abortion of apical ovaries is decreased when all silks are pollinated on a single day, compared to that occurring under a natural a-synchronous pollination in which new silks are fertilized every day (Cárcova *et al.*, 2000; Uribebarrea *et al.*, 2008). Apical abortion is increased if fertilization occurs at two different dates via an artificial a-synchronous pollination (Freier *et al.*, 1984; Cárcova & Otegui, 2001).

This suggests that the fertilization of a first generation of ovules can stop the development of younger ovaries and cause their abortion. The steeper the gradient of ovary growth between basal and apical ovaries was, the more abortion occurred (Cárcova & Otegui, 2007).

The maize ear is a spike composed of spikelet pairs arranged in rings (generally 8 to 20 ovaries per ring) sequentially initiated at ear apex, thereby generating cohorts of ovaries (Bonnett, 1940; Kiesselbach, 1949). Hence, basal ovaries are the oldest and apical ovaries the youngest, and all ovaries from a same cohort have a synchronous development. Because silk emergence occurs from the oldest basal ovaries to the youngest apical ovaries (Bassetti & Westgate, 1993a,b; Cárcova *et al.*, 2003), and water deficits strongly decrease silk growth which generates a delay in silk emergence (Fuad-Hassan *et al.*, 2008), natural pollination during drought period may reproduce an asynchronous pollination causing abortion of apical ovaries.

We have tested if a developmental mechanism linked to the timing of silk emergence and pollination could be a major cause of ovary abortion under water deficit. For that, we have explored a range of abortion rates caused by various degrees of water deficit in different genotypes, and followed the growths of ovaries and silks as a function of time and of their position on the ear in each scenario. We have analyzed in this way the link between the abortion frequency of apical ovaries and the base-apex gradient of development.

Table 2-1. Environmental conditions during the three presented experiments in growth chamber (GC) or greenhouse (GH). Mean temperature (T, °C) and vapor pressure deficit (VPD, kPa) of day and night are mean values from tassel emergence to 7 days after silk emergence. Photosynthetic photon flux density (PPFD, mol.m².d⁻¹). Parentheses, standard deviation.

Experiments	Growth conditions	T Day	T Night	VPD Day	VPD Night	Photo period	PPFD
Exp1	GC	25.69 (1.02)	25.53 (0.80)	0.82 (0.18)	0.82 (0.10)	16	23.47 (3.48)
Exp2	GH	23.30 (1.96)	20.06 (1.16)	1.64 (0.43)	1.22 (0.23)	14	9.55 (1.18)
Exp3	GH	24.04 (1.58)	20.91 (1.30)	1.88 (0.48)	1.19 (0.33)	14	10.09 (0.19)

Table 2-2. Time interval between tassel emergence (TE) and first silk emergence (SE), and anthesis-silking interval (ASI) in the three experiments. In all experiments, tassel emergence coincided with the time when watering was withheld. WW, control plants in well-watered treatment. WD1, plants in first water deficit treatment, WD2, plants in second water deficit treatment. S, plants with a synchronous pollination. AS, plants with an asynchronous pollination. All plants except in S and AS treatments were hand-pollinated daily with fresh pollen. Number in parentheses, 90% confidence intervals ($n \geq 3$).

Experiments	Genotypes	Treatments	TE to SE (days)	ASI (days)
Exp1	B73_H	WW	2.45 (0.45)	-1.71 (0.32)
		WD1	4.74 (0.66)	0.65 (0.45)
		WD2	7.77 (1.82)	3.17 (1.42)
Exp2	B73_H	WW	2.67 (1.95)	0.33 (1.95)
		WD3	6.75 (3.66)	5.13 (3.59)
	F924_H	WW	1.67 (0.97)	0.33 (1.95)
		WD3	3.67 (3.07)	2.22 (3.26)
	MS153_H	WW	3.33 (1.95)	0.67 (2.57)
		WD3	7.13 (4.17)	5.38 (3.95)
Oh43_H	WW	2.00 (0.00)	0.50 (0.68)	
	WD3	5.11 (3.79)	3.78 (3.52)	
Exp3	B73_H	N	2.38 (0.61)	-2.12 (0.66)
		S	2.29 (0.55)	-2.57 (0.39)
		AS	2.50 (1.25)	-2.66 (0.85)

Materials and methods

Plant material, growing conditions and pollination

Three experiments were carried out (Table 2-1). Plants were grown in a greenhouse in cylindrical plastic pots (12L for Exp1 and Exp3, and 9L for Exp2) at a plant density of 3 plant m⁻². Genetic material included 4 maize hybrids obtained from the cross of the flint line UH0007 by the dent lines B73, F924, MS153 and Oh43. Three seeds per pot were sown in a compost composed of clay and peat 30:70 v/v enriched in minerals. Plants were thinned to one per pot at the 2-leaf stage. Each pot was placed on a balance which allowed calculating soil water content from pot weight, corrected by estimated plant weight, estimated by regularly sampling plants (Caldeira *et al.*, 2014). All plants were maintained at a soil water potential above -0.12 MPa by daily irrigation, except for a short period around flowering for plants in water deficit (WD) treatments (Fig. 2-1a).

At tassel emergence, recorded individually in each plant, water was withheld until soil water content reached the desired soil water potential, i.e. for 3 days (Fig. 2-1a). Pots were then watered at the end of each day to restore the desired soil water potential (Ψ_p), namely -0.22 and -0.48 MPa for WD1 and WD2 treatments of Exp1 and -0.6 MPa in the water deficit of Exp 2 (see Caldeira *et al.* (2014) for detail of the method). Soil water potential decreased during the day and reached -0.44 MPa in WD1 and -0.98 MPa in WD2 and WD3 (Fig. 2-1a).

Plants were transferred into a growth chamber from tassel emergence to 7 days after silk emergence in Exp1, while they remained in the greenhouse in Exp 2 (Table 2-1). All plants were hand-pollinated twice a day with fresh pollen originating from well-watered plants distributed in the greenhouse or in the growth chamber, until the last emerged silks became senescent. Experiment 3, involving pollination treatments, was carried out in the greenhouse in well-watered conditions similar to those in the other two experiments. Two pollination treatments were carried out in addition to the pollination technique presented above. A synchronous pollination was obtained by enclosing ears in bags from silk emergence to eight days after it, and then pollinating all silks with fresh pollen. An asynchronous pollination was obtained by pollinating silks for the two days following silk emergence, then enclosing ears in bags for six days and finally pollinating all silks. Plants with silks cut every day in Exp2 (see below) were hand-pollinated 1h after silks were cut, without any decrease in pollination success and grain set.

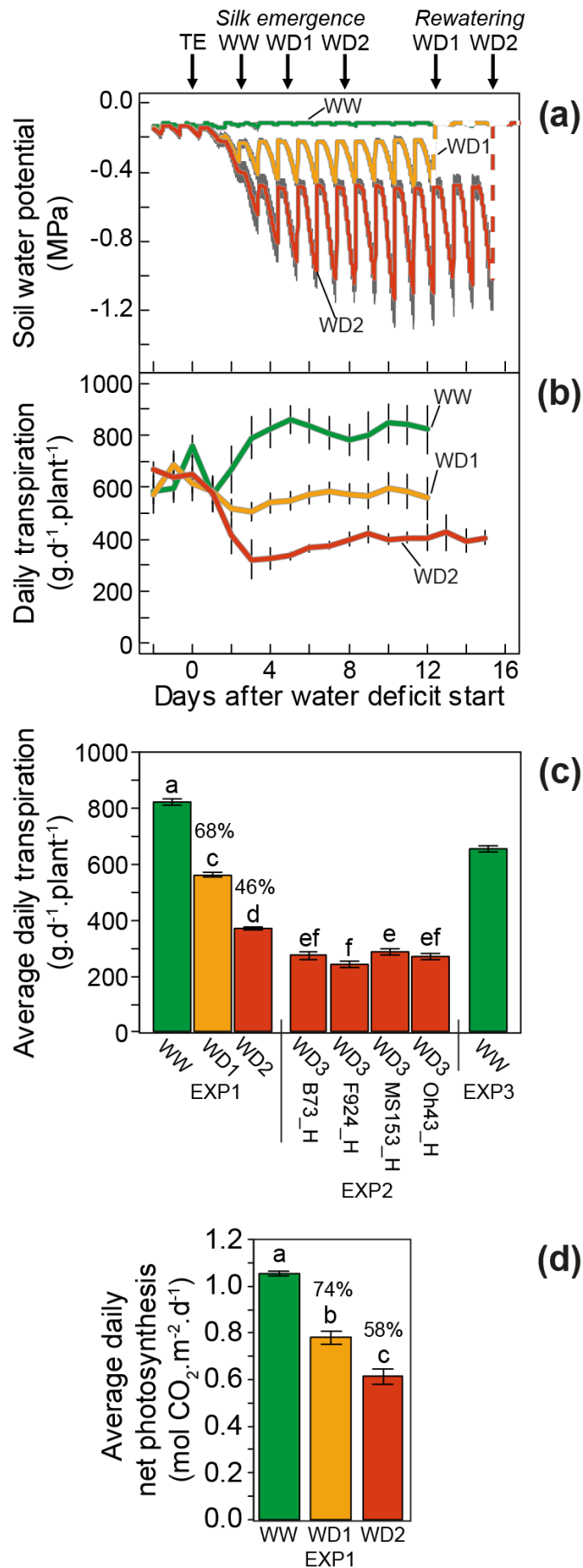


Figure 2-1. Time course of soil water potential **(a)** and daily transpiration **(b)** during the period of water deficit in the 3 treatments in Exp1. **(c)** Mean daily transpiration from the 3rd day of water depletion to re-watering in Exp1 (WW, WD1 and WD2 treatments), Exp2 (WD in four maize hybrids) and Exp3 (WW). **(d)** Net photosynthesis in Exp1, mean values from 3 days after the beginning of water deficit to re-watering time (4, 19 and 5 replicates in WW, WD1 and WD2 respectively). Green, WW; yellow, WD1; red, WD2 and WD3 in Exp1 and Exp2 respectively. In **(a)** TE, tassel emergence (and beginning of water deficit); dashed lines, soil water potential after re-watering. In **(a, b)** error bars, 95% confidence intervals ($n \geq 4$). In **(c, d)** error bars, standard error ($n \geq 3$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$). Percentages, transpiration or net photosynthesis in water deficit compared to WW. Transpiration of control plants in well-watered treatment in Exp2 are not represented here, and were close to 700g.d⁻¹.

Photosynthesis measurement

Plant photosynthesis was followed in Exp1 from 3 days after tassel emergence until 7 days after silk emergence on the ear leaf (leaf number 10 or 11) by using a CIRAS-2 portable gas exchange system (PP Systems, Amesbury, MA, USA) with a 2.5cm² leaf chamber and an air flow rate of 300cm³.s⁻¹. Light intensity was similar in the growth chamber at leaf level and in the gas exchange system (425 μmol.m⁻².s⁻¹). Air temperature and vapour pressure deficit in the chamber of CIRAS-2 also mimicked the environmental conditions in the growth chamber, i.e. 25°C and 1-1.5kPa. Measurements were carried out for the whole photoperiod (16 h) of 4, 19 and 5 plants, in WW, WD1 and WD2 respectively.

Plant sampling, ovary volume and Relative Expansion Rate

Ears were sampled 1d after tassel emergence, at silk emergence, and on 7d and 23d after it in each treatment of Exp 1. The first sampling was performed on a companion subset of plants and considered to be common to all treatments because it occurred before any water deficit. Ears were sampled 23 and 15d after silk emergence in Exps 2 and 3, respectively. Sampling dates were therefore different in each individual plant, in order to fit individual developmental stages. Samples were collected at the end of the day and fresh weight of ear and silks were immediately measured. Ears were photographed and ovary or grain number and dimensions were measured with the software IMAGE J®. Two rows of ovaries were chosen in the central part of the picture. The width (W_o) and height (H_o) of each ovary were measured at each position along the row counted from ear base. Considering that ovary rows are contiguous without space between them and that ear cross-sections are circular, ovary cross-section occupy the external ring of a circle of circumference $N_o * W_o$, where N_o is the number of rows and W_o is the mean ovary width at the considered position. Ovary area at each cross section depends on the ratio of cob diameter to ear diameter ($R_{c/e}$), measured across sampling dates, position along the ear and genotypes. Ovary volume (V) was calculated at each position along the rows as the product of cross-section ovary area by ovary height according to the following equation:

$$(1) V = \frac{H_o N_o W_o^2 (1 - R_{c/e}^2)}{4\pi}$$

Because ovary growth was essentially exponential during the studied period, we characterized it with the rate of the exponential curve of volume ovary against time. The ovary relative expansion

rate (*RER*) between two sampling times t_1 and t_2 was calculated at each position along the ear from the average volume measured at t_1 (V_1) and t_2 (V_2):

$$(2) RER = \ln(V_2/V_1)/(t_2 - t_1)$$

Ovary expansion rate (*ER*) at a given date t_1 was calculated as:

$$(3) ER_1 = RER_1 * V_1$$

A normalized ovary position was calculated to take into account the variability of the position of the ovary with maximum volume between replicates. For each observed ear, ovary positions were corrected by the difference between the position with maximum volume of the considered ear and the average position of maximum volume for the whole sample.

Silk emergence dynamics and grain number

The number of emerged silks was determined daily in Exp3 on 3 plants per treatment with the method described by Carcova *et al.* (2000). Exposed sections of silks were cut from the apical ear of the same plants. All newly exposed silks, characterized by their bisected apical end, were manually counted to develop a cumulative curve of silk emergence. Sampled silk sections were stored in 90% ethanol solution at 4°C before counting. The number of exposed silks was counted in the same way at 3 developmental stages in Exp1. Furthermore, to directly observe silk emergence in the different water treatments, time-lapse videos were realized upon some ears to account of characteristic silk emergence patterns. Image capture was performed with an automaton, based on a Raspberry Pi® (Model B rev.2, Farnell-element14, Leeds, UK) which controlled image capture every 5 minutes of several USB cameras (C920, Logitech, Lausanne, CH) and triggered additional lighting during the night at the moment of capture (~4 seconds). Time-lapse videos are available in SI. The number of aborted grains was estimated at the last sampling date (15 to 23 days after silk emergence according to the experiments).

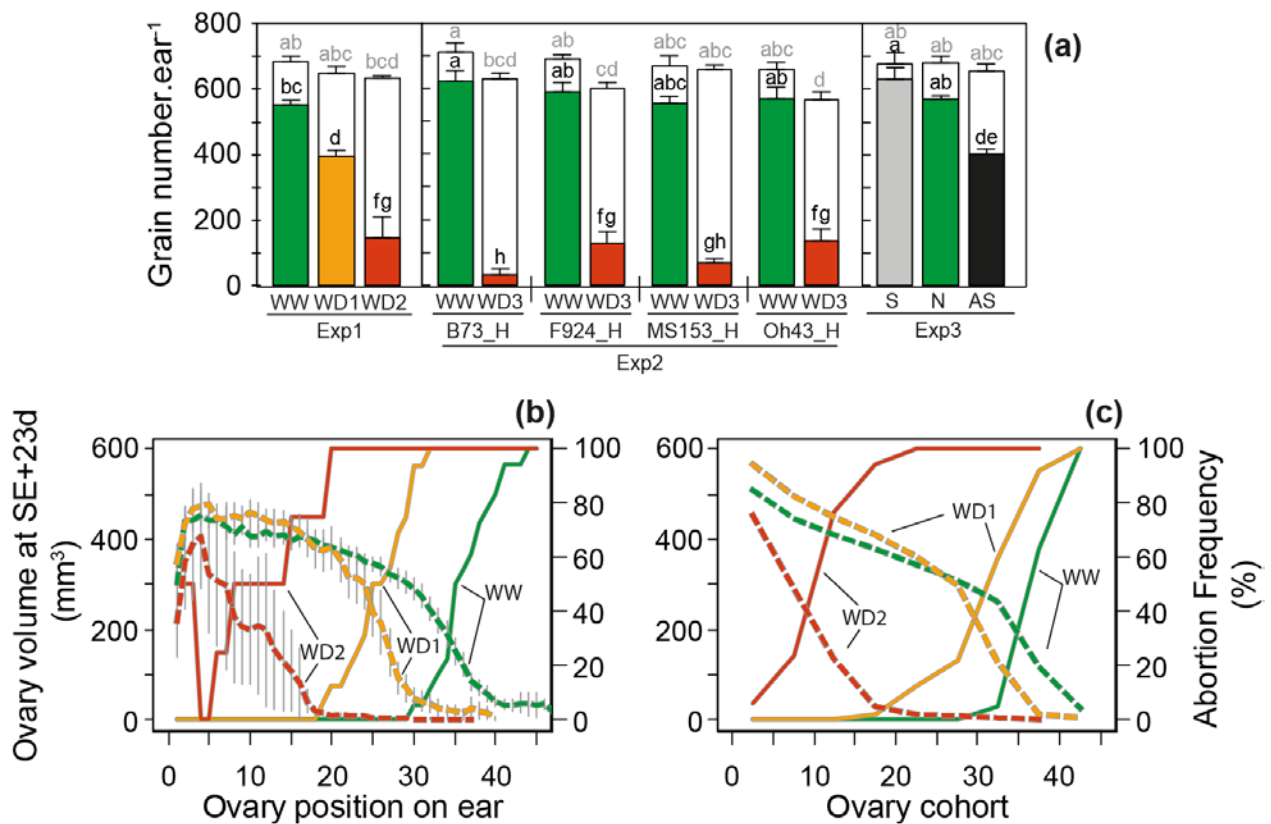


Figure 2-2. (a) Grain number per ear (colored bars) and number of ovaries per ear (total bars) as a function of treatments, experiments and genotypes in Exp1, Exp2, and Exp3. (b, c) Ovary volume (solid lines) 23 days after silk emergence (SE+23d) and abortion frequency (dashed lines) as a function of ovary spatial position along the ear from base to apex (b) or ovary cohort from earliest to latest (c) in Exp1. Green, WW; yellow, WD1; red, WD2 and WD3 in Exp1 and Exp2 respectively; grey, synchronous pollination (S); black, asynchronous pollination (AS). Other plants were hand-pollinated daily with fresh pollen. In (a) error bars, standard error ($n \geq 3$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$): black letters for grain number, and grey letters for number of initiated ovaries. In (b) error bars = 90% confidence intervals ($n \geq 4$).

Results

A range of abortion rates was caused by water deficits with limited effects on photosynthesis and transpiration.

A range of abortion rates, from 29 to 95%, was observed in two experiments with contrasting water deficits (Table 2-1, Fig. 2-2a). They depended on the intensity of soil water deficit, with 394 and 146 grains respectively in the mild (WD1) and moderate (WD2) water deficits of Exp1 (Fig. 2-1a, $\Psi_p = -0.22$ and -0.48 MPa, respectively). Watering treatments, involving day-night alternations of soil water potential (Fig. 2-1a), had a limited effect on transpiration rate (32 and 54% respectively in WD1 and WD2, Fig. 2-1b,c) and on photosynthesis (26% and 42%, Fig. 2-1d). A second experiment (Exp2) compared four hybrids in a water deficit similar to most severe ones observed in the field (Fig. 2-1c, $\Psi_p = -0.6$), with large differences in abortion between hybrids (Fig. 2-2a). The number of ovaries per ear was similar in all treatments, experiments and hybrids (Fig. 2-2a), so the effect of water deficit on grain number acted via ovary/grain abortion. A slight decrease in ovary number was observed in the water deficit treatment of Exp2, but probably reflected our difficulty to quantify the number of very small ovaries at apical positions of the ear in this severe treatment. Each initiated ovary comprised a silk primordium.

Silk emergence occurred 2-3d after tassel emergence in well watered plants regardless of experiments and genotypes (Tab. 2-2). It was delayed by 2.3 and 5.3d, respectively, in WD1 and WD2, so ASI ranged from -1.7 to 3.1d as anthesis was synchronous in the three water regimes. It is worth mentioning that silks were hand-pollinated every day with fresh pollen of WW plants, so observed abortions were not a consequence of pollen availability or viability.

The base-apex gradient of abortion frequency shifted to more basal positions on the ear with increasing water deficit

The abortion frequency increased with ovary position in all watering treatments. It became appreciable beyond the 6th, 20th and 31st ovary positions in WD2, WD1 and WW, respectively, and reached 100% at the 20th, 32nd and 44th ovary positions in the same treatments (Fig. 2-2b). It was not linked to ovary volume at silk emergence, which did not differ significantly between treatments at silk emergence at any position along the ear (Fig. 2-3a). For example, ovary volume at the 23rd position from ear base was close to 10 mm³ in all treatments, whereas the abortion

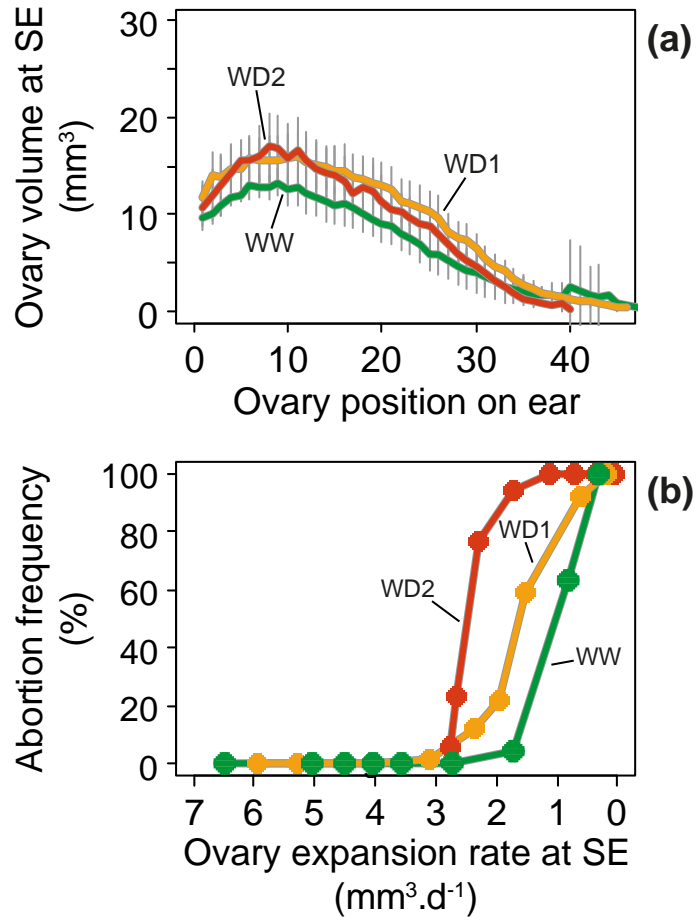


Figure 2-3. (a) Ovary volume at silk emergence as a function of spatial position along the ear in treatments WW, WD1 and WD2. (b) Relationship between ovary growth rate at silk emergence (SE) and abortion frequency for the different ovary cohorts in the 3 watering treatments. Green, WW; yellow, WD1; red, WD2. Points correspond to ovary cohorts presented in Fig. 4. In (a) error bars = 90% confidence intervals ($n \geq 4$).

frequency for these ovaries was 0, 25 and 100% respectively in WW, WD1 and WD2 treatments. Because ears needed more time to reach silk emergence in water deficit (Tab.2-2), similar ovary volumes at silk emergence resulted from a combination of an increased duration and a decreased rate of ovary growth.

A common developmental ranking of ovaries based on the time courses of ovary volume applied to plants regardless of their water status.

In WW plants, ovaries underwent exponential growth from 2.5d before silk emergence till 7d after it (Fig. 2-4a, d), with nearly uniform relative expansion rates ($0.43 \text{ mm}^3.\text{mm}^{-3}.\text{d}^{-1}$) at all positions of the ear during the whole period (Fig. 2-4g, h). Hence, the time courses of ovary volumes were all parallel if expressed in a log scale, with different initial volumes 2.5d before silk emergence (Fig. 2-4d). Basal ovaries had the highest volume at that time (e.g. 4.7 mm^3 for ovaries at the 6th position on the ear), while apical ovaries were still very small (e.g. 0.55 mm^3 at the 40th position). The large difference in volume between basal and apical ovaries 7d after silk emergence reflected this difference in initial volume, a classical pattern in exponential growth. For each ovary position, the developmental delay relative to most advanced ovaries is given by the dates at which the successive parallel lines cross a horizontal line. It is therefore possible to rank ovary precocity according to these dates. For instance, the volume of basal ovaries 2.5d before silk emergence (4.7 mm^3) was reached by the most apical ovaries 7d after silk emergence, so apical ovaries were delayed by 9.5 days compared with basal ovaries. This defines cohorts of ovaries developing sequentially, characterized each by a common position on the ear (“ring” of ovaries with common positions on the ear) and a synchronous development. The relationship between ovary position on the ear and cohort number (Fig. 2-5) was essentially linear for ovary positions higher than 10 (cohort number equalled ovary position). Most basal ovaries (positions 1-3) were behind those at positions 5-8, consistently with previous studies showing that the earliest florets for silk emergence are at positions 5-10 (Bassetti & Westgate, 1993a,b).

Plants subjected to mild or moderate water deficits (WD1 and WD2) followed the same pattern as WW plants during the period from tassel emergence to silk emergence (Fig. 2-4g), with a nearly uniform relative expansion rate in the whole ear but lower than in WW plants (0.27 and $0.13 \text{ mm}^3.\text{mm}^{-3}.\text{d}^{-1}$). The same cohorts of ovaries, as defined in WW, applied to ears in WD1 and WD2 (Fig. 2-5).

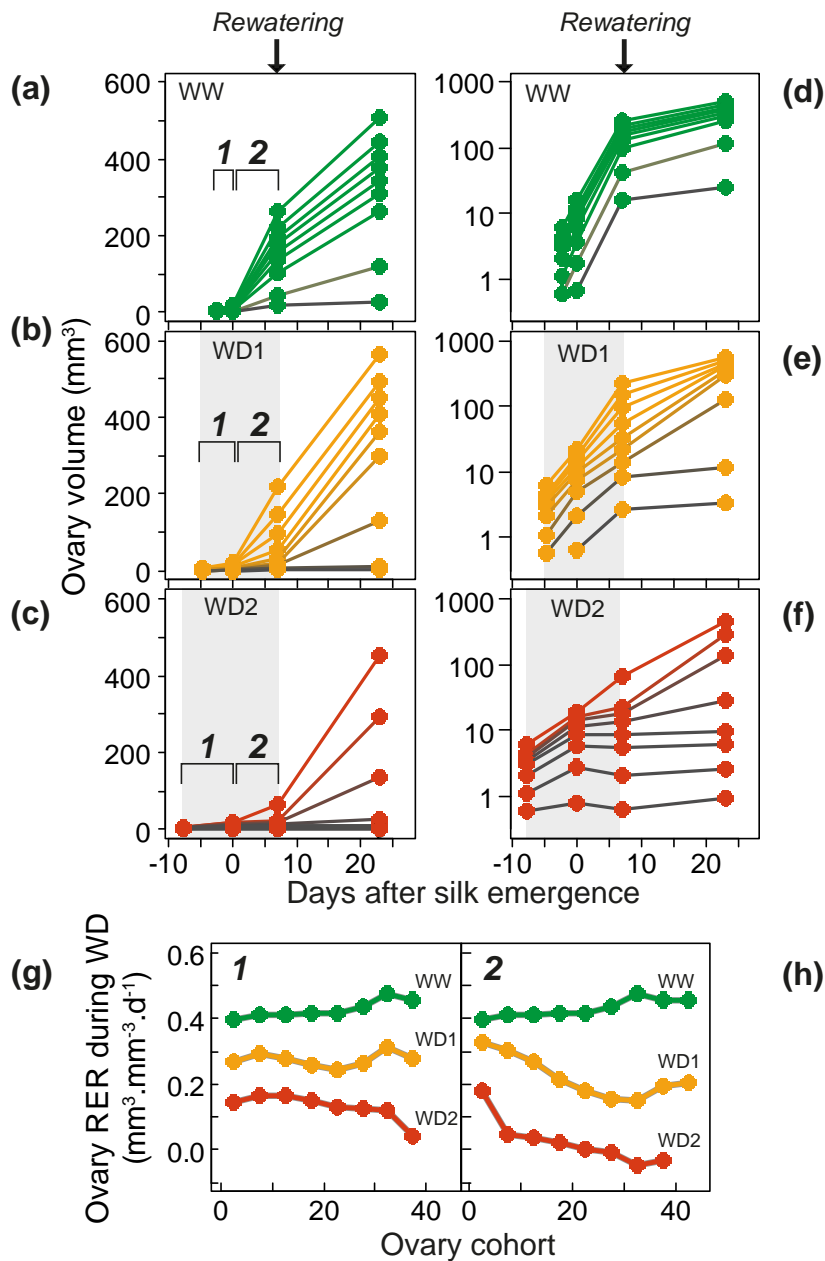


Figure 2-4. Time course of ovary volume for successive ovary cohorts in treatments WW, WD1 and WD2, presented in natural (a-c) or logarithmic scales (d-f). Each line, mean of 5 cohorts from 1st to 45th (g, h) Relative expansion rate (RER) of ovaries, presented every 5th cohort. In (g) RER was calculated from tassel emergence to silk emergence (interval 1 in a-c). In (h) RER was calculated from silk emergence to 7 days after it (interval 2 in a-c). The water deficit period is shaded in (b-f), rewatering occurred 8 days after silk emergence.

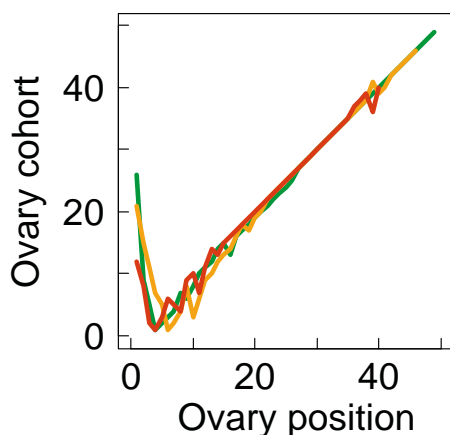


Figure 2-5. Relationship between ovary spatial position along the ear (from base to apex) and cohort number (from earliest to latest) in well-watered (green), moderate water deficit (yellow, WD1), and mild water deficit (red, WD2) treatments in Exp1.

Abortion in all treatments concerned cohorts of ovaries with the most delayed development along the ear

Appreciable gradients of relative expansion rate in the ear occurred in water deficit during the seven days following silk emergence, to the difference of the WW treatment (Fig 2-4h). In both WD1 and WD2, basal cohorts of ovaries continued growth with an unchanged relative expansion rate whereas ovaries with more apical positions had a decreased rate. In WD2, apical ovaries of cohorts 16 to 40 ceased growth after silk emergence and did not recover after rewatering. Those in cohorts 1 to 5 continued growth after silk emergence. Intermediate cohorts 6 to 15 had a reduced growth, which did not fully recover after rewatering. In the mild water deficit WD1, the same behaviours were observed but at more apical positions. Ovaries belonging to cohorts 21 to 35 had a reduced growth, which partly recovered at rewatering, and ovaries of cohorts 36 to 45 did not. It is noteworthy that the same overall pattern applied in WW plants at even more apical positions than in WD1, with most apical cohorts 41-45 stopping growth 7d after silk emergence.

Ovary growth during the 7d after silk emergence was linked to the final abortion frequency. No ovary aborted in the early cohorts with an unchanged relative expansion rate during this period, whereas 100 % abortion occurred in delayed cohorts with a reduced growth after silk emergence and no recovery afterwards. Intermediate cohorts had intermediate abortion frequencies in accordance with their precocity ranking, from basal to apical positions of the ear (Fig. 2-2b). An apparent discrepancy can be observed at most basal ovaries in plants subjected to WD2 (Fig. 2-2b), in which the most basal ovaries at position 1-3 had higher abortion frequencies than ovaries at 4-6th positions on the ear. This is consistent with the fact that most basal ovaries had a delayed development compared to those at positions 5-8 (Fig. 2-5). Hence, this apparent inconsistency reinforces the link between ovary development and final abortion (Fig. 2-2c).

Relationships between abortion frequency and ovary growth rate at pollination are presented in Fig. 2-3b. Abortion frequency was clearly associated to ovary growth rate, but the threshold value for abortion differed between treatments, namely $1.71 \text{ mm}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ in WW plants, vs 2.36 and $2.77 \text{ mm}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ in WD1 and WD2. Hence, abortion frequency cannot be considered as depending on ovary growth rate only, so we had to refine the analysis by considering silk growth.

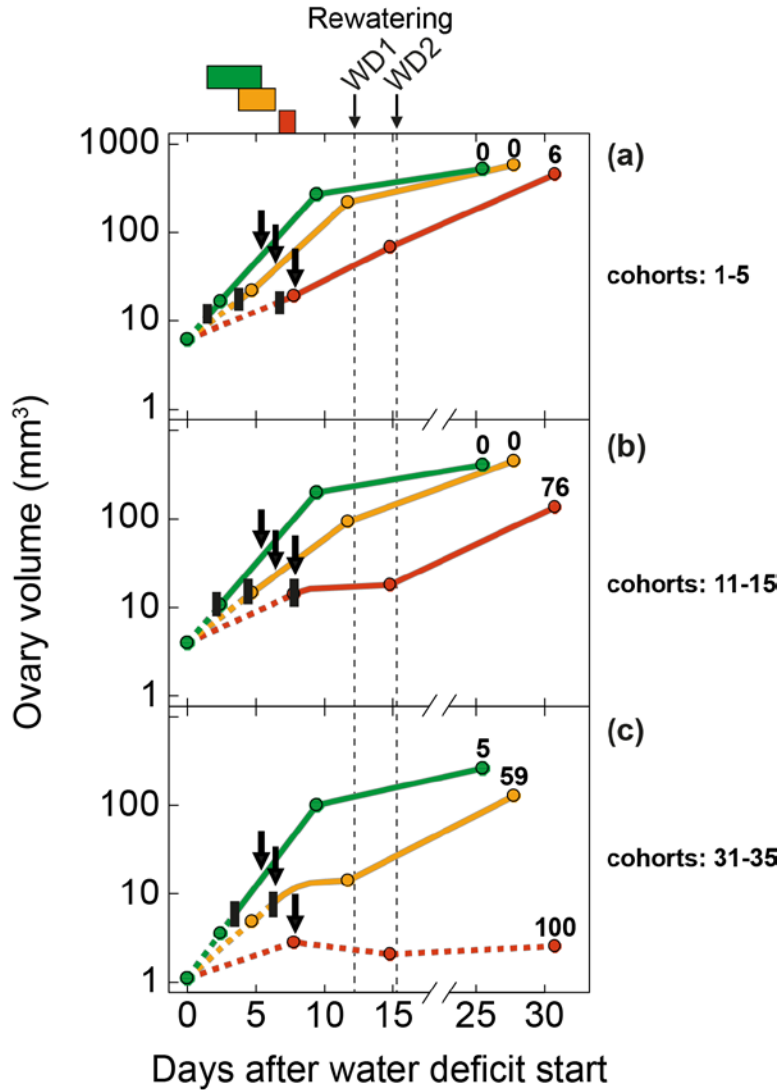


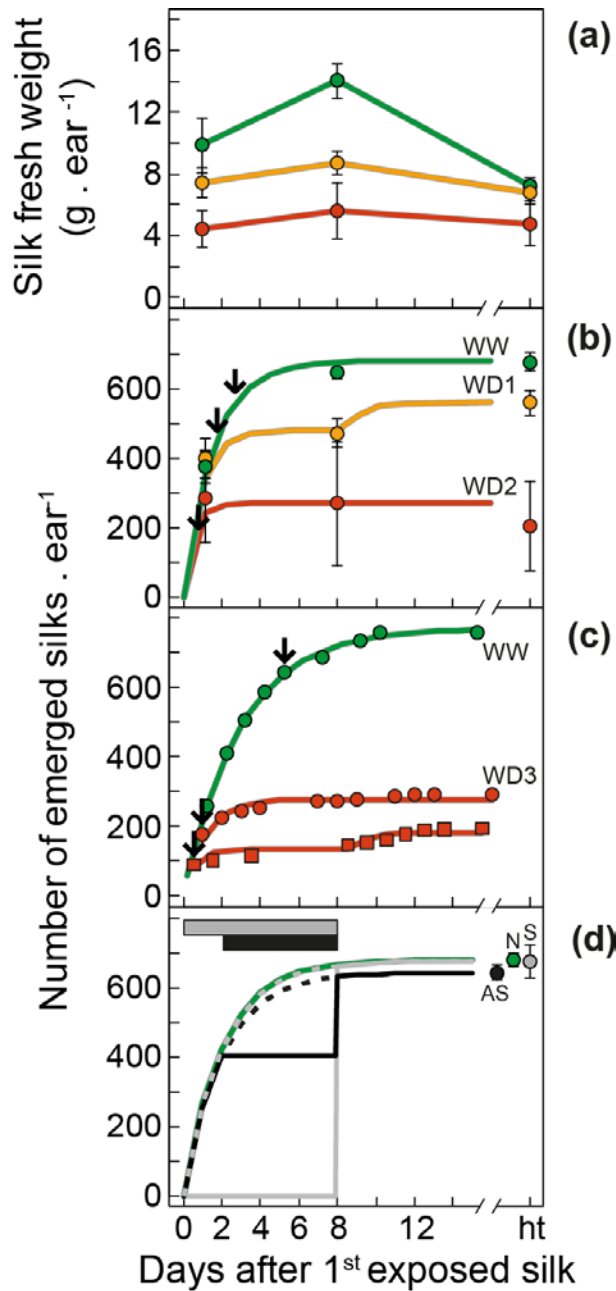
Figure 2-6. Ovary volume in basal (a), middle (b) and apical positions of the ear (c) in Exp1. Arrows, last silk emergence in each treatment. Numbers, abortion frequency for each treatment and position. Dotted lines represent the period before emergence of the corresponding silks. Horizontal bars above (a), period of silk emergence for each treatment. Vertical dashed lines, rewatering in WD1 and WD2. Green, WW with natural pollination; yellow, WD1; red, WD2.

The time courses of silk emergence and the number of emerged silks largely depended on watering treatments

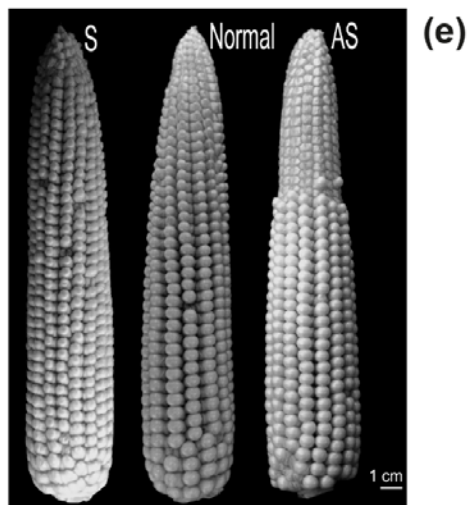
Silks of the different ovary cohorts emerged sequentially from the husks over 1 to 8d depending on watering treatments of Exp1. The end of silk emergence differed between treatments, but occurred in all cases before any decrease in ovary growth (Fig. 2-6). Consistently, silk fresh weight differed between watering treatments at silk emergence (Fig. 2-7a), whereas the volume of ovaries did not.

In a second experiment (Exp 2, Table 2-1), silk emergence was followed via daily non-destructive assessment of the number of emerged silks in individual plants. In WW plants, the number of emerged silks increased rapidly for 7d following the emergence of the first silk and stabilized at 630 appeared silks (Fig. 2-7c). In water deficit, a reduced number of silks (e.g. 294 and 147 in the individual plants presented in Fig. 2-7c) appeared over one or two days only. These time courses are consistent with those obtained with a lower time definition in Exp1 presented in above paragraphs, in which the final number of emerged silks per ear was 677, 558 and 203 in WW, WD1 and WD2 treatments, respectively. In well watered plants all silks emerged from the husks at the latest 8d after the emergence of the first silk (Fig. 2-7b), so the final number of emerged silks equalled the number of ovaries presented in Fig. 2-2a. Conversely, the final silk number was considerably smaller than ovary number in water deficits of Exps 1 and 2 (Fig. 2-7b, c). Silk emergence stopped 1-2d after the emergence of the first silk because of growth arrest of all the silks not yet exerted from the husks (Fig. 2-7b). Consistently, the growth of all emerged silks stopped simultaneously (SI Video S1). The arrest of silk growth under water deficit was probably independent of fertilization processes because it occurred in extreme cases before any silk emergence. This was the case for 40% of plants of hybrid B73 in Exp 2, whose silks stopped growth inside the husks, without any pollination or fertilization.

A second period of silk emergence occurred after re-watering of plants subjected to the moderate water deficit WD1 in Exp1 (Fig. 2-7b), as indicated by the increase in the number of emerged silks between the last two sampling dates. This was also observed on some plants in Exp. 2 (Fig. 2-7c). The new emerged silks corresponded to silks that previously stopped growth inside the husks during the period of water deficit and recovered afterwards.



(a) **Figure 2-7.** Time courses of silk fresh weight (a), and of silk emergence in Exp1 (b), Exp2 (c) and Exp3 (d). Green, WW; yellow WD1; red WD2 and WD3 in Exp1 and Exp2 respectively; grey, synchronous pollination (S); black, asynchronous pollination (AS). (e) Ears 15 days after silk emergence in Exp3. The final point in (b-d) (ht) corresponds to the number of emerged silk observed 23 days after silk emergence (15 days in Exp3). In (b), circles, hybrid B73_H, squares, MS153_H. In (d) solid lines represent the number of exposed silks which differed from the number of emerged silks (dotted lines) during the time ears were covered in S and AS treatments. Error bars, 90% confidence intervals ($n \geq 4$). Arrows: date when number of emerged silks equaled final grain number.



Final grain number was closely linked to the number of emerged silks, with a difference that increased with ear age and with asynchronous pollination

The final number of emerged silks largely accounted for differences in grain number between individual plants of Exp1, in all watering treatments considered jointly (Fig. 2-8a, $r^2=0.75$). The 1:1 line in Fig. 8a indicates the maximum possible grain number, representing the case in which all ovaries with emerged silks develop into grains. The vertical distance to this line represents the number of ovaries that aborted although their silks had emerged and were pollinated. This number was close to zero for plants in WD2 treatment and reached 200 in plants in WW (Fig. 2-8a). In WD1, it was close to the number of silks that emerged after re-watering, indicating that corresponding ovaries did not set grains. The same relationship also accounted for abortion rates in the four studied hybrids subjected to either well-watered conditions or water deficit (Exp2).

Overall, these results indicate that the abortion frequency of a given ovary cohort closely depended on the emergence/non emergence of the silks of these ovaries above the husks. This event accounted for 75% of the variance at the individual plant level, including the effects of watering treatments in one experiment, and 94% of the variance at treatment level (3-18 plants), including the effects of three watering treatments in two experiments and of genetic differences between four hybrids in one experiment. Hence, the major part of abortion rate was already determined when last silks emerged, i.e. 2-6 d after silk emergence. The switch to abortion actually occurred slightly earlier than the end of silk emergence if one considers the time at which the number of emerged silks equalled the number of grains (arrows in Fig. 2-7), i.e. 1 d after silk emergence in WD treatments and 3-4d after it in WW plants.

We have tested this relationship with an experiment with synchronous, natural or asynchronous pollinations (Exp 3 Table 2-1), which induced marked differences in abortion rate (Fig. 2-2a, and 2-7d). In the synchronous pollination, all silks were exposed to pollen 8d after silk emergence. In the asynchronous pollination, the first emerged silks originating from basal positions of the ear were exposed to pollen the 1st and 2nd days after the emergence of first silks and the remaining silks were exposed 6d later (Fig. 2-7d). As in results obtained by other groups (Cárcova *et al.*, 2000; Uribebarrea *et al.*, 2008), a synchronous pollination caused a decreased abortion rate from 16 to 6 % compared to natural pollination, with more ovary positions located near the ear apex growing into grain than in the natural pollination (Fig. 2-2a). 94% of ovaries with emerged silks

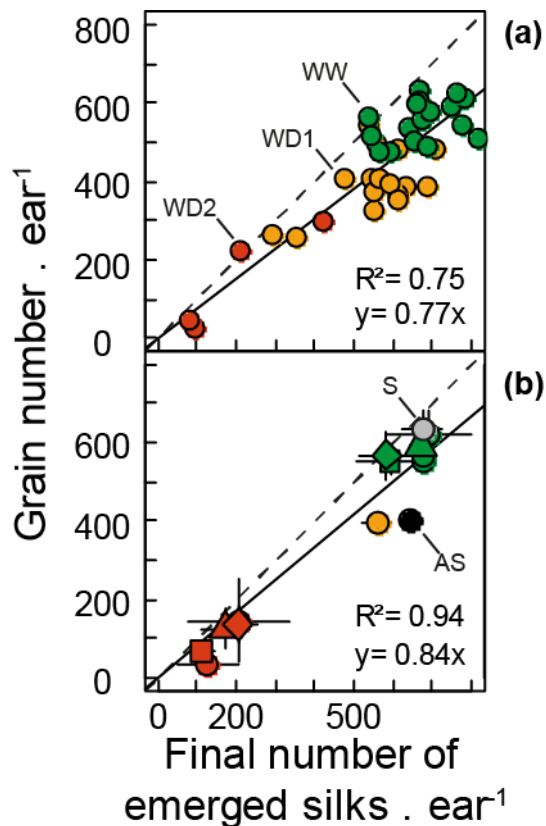


Figure 2-8. Grain number as a function of the final number of emerged silks. In (a) each symbol represents a plant of Exp1. In (b), each symbol represents mean values corresponding to an experimental treatment in Exp1 to 3. S, synchronous pollination; AS, asynchronous pollination. Circles, hybrid B73_H; triangles, hybrid F924_H; squares, hybrid MS153_H; diamonds, hybrid Oh43_H. Green (WW, natural pollination); yellow, WD1; red WD2 and WD3 in Exp1 and Exp2 respectively; grey, synchronous pollination (S); black asynchronous pollination (AS). Black line, linear regression; dashed line, 1:1. Error bars, 90% confidence intervals ($n \geq 3$). All plants were hand-pollinated daily with fresh pollen except in treatments S and AS.

grew into grain in this case, so corresponding plants were nearly on the 1:1 line of Fig. 2-8b. In plants subjected to asynchronous pollination, only ovaries whose silks were exposed to the first pollination developed into grains, while those ovaries whose silks were exposed to pollen on the second date did not. Points corresponding to these plants were clearly below the 1:1 line in Fig. 8b, with 240 ovaries with emerged silks that aborted.

Hence, the final grain number departed from the number of emerged silks by 6 (synchronous) to 39% (a synchronous) depending on watering treatment and time course of pollination. Grain number equalled the number of emerged silks when pollination was synchronous for all silks. This was the case in the treatment with artificial pollination synchrony, but also in plants subjected to water deficit in which all silks emerged in 1-2d. Natural or artificial a-synchronous pollination caused supplementary abortion, with the tendency that ovaries progressively lost part of their competence to grow into grains. This would explain the higher differences between the numbers of emerged silks and of grains in the treatment with asynchronous pollination, but also when re-watering allowed a second generation of emerged silks whose corresponding ovaries still aborted. The discrepancy between emerged silks and grains only concerns WW plants or the infrequent case when plants exposed to drought receive a rain occurs during silk emergence, so it can be concluded that the time course of silk emergence accounted for most part of ovary abortion under the studied range of water deficits.

Discussion

A revised view of the timing of events leading to ovary/grain abortion and on the date of the switch to abortion

The results presented here lead us to propose the following sequence of events, with several steps and four different switches to abortion.

- *A decrease in the growth rates of ovary and silks until silk emergence:* Ovaries and silks are initiated sequentially on the ear (cohorts) and grow exponentially until silk emergence, with a gradient of ovary age from the base to the apex of the ear. This phenological phase involves the development of the female gametophyte (meiosis, embryo sac formation) (Huang & Sheridan, 1994) Water deficit at this stage decreases the relative expansion rates of ovaries (this study) and of young silks growing inside the husks (Fuad-Hassan *et al.*, 2008). Conversely, the carbon status of young ovaries was not appreciably affected by water deficit at this stage in our study (Oury *et al.* submitted as companion paper).

- *Silk emergence was delayed by water deficit because of a lower silk growth rate.* In our study, this resulted in similar ovary volumes regardless of plant water status at the emergence of the first silks, with an unchanged base-apex gradient of ovary volume on the ear. This compensation of a lower expansion rate by a longer duration of growth under water deficit might be seen as an adaptive process allowing ovaries to keep an adequate status at the time of pollination and fertilization. In any case, this rules out the possibility that abortion is linked to ovary volume or to its spatial gradient at silk emergence. The possibility that drought-associated abortion is linked to ovary growth rate at this time is also unlikely, because the relative expansion rate of ovaries was affected by the same ratio in basal ovaries that will develop into grains, and in apical ovaries that will abort later on.

- *The first and main switch to abortion would involve the timing of silk emergence.* Silks emerge from the husks following a base-apex order except for the five most basal positions on the ear (Bassetti & Westgate, 1993a,b), thereby following the ovary cohorts defined in Fig. 2-5. In our study, water deficit caused an early arrest of silk growth and emergence, thereby drastically reducing the number of emerged silks and the duration of their growth out of the husks. The silks of the latest cohorts of ovaries did not emerge, thereby causing abortion of apical ovaries. Results of Fuad-Hassan *et al.* (2008) suggest that the duration of silk growth from initiation is unaffected by water deficit. Any delay of silk emergence would, therefore, result in a shorter duration of silk

growth during and after silk emergence. This was observed here, from 8d in WW conditions to 1d in severe water deficit. In one hybrid (B73_H), silk growth even stopped before emergence in an appreciable proportion of plants, so this arrest was independent of ovule fertilization. Our analysis suggests that the timing of silk emergence and the resulting number of emerged silks are a major cause of abortion under water deficit because it accounted for a very large proportion of the variance of grain number in a dataset involving two experiments, three levels of water deficit and four hybrids.

- *A second switch to abortion occurred a few days following silk emergence, accounting for up to 20% of abortion rate.* While the most basal cohorts of ovaries, whose silks appear first (Bassetti & Westgate, 1993a), developed to grain in all treatments, the more apical cohorts whose silks appeared later had an appreciable abortion frequency. This switch to abortion was not observed when all silks were fertilized synchronously, nor in severe water deficit in which all silks appeared in one day. A delay in fertilization caused by the natural asynchrony of silk emergence, by artificial asynchrony or by rewatering plants with arrested silks caused abortion of the last cohorts of ovaries with a postponed silk exposure. This suggests that ovaries progressively lose competence to be fertilized after the first fertilizations, so a delay in pollination would cause abortion. This abortion mechanism could be that fertilization of oldest ovules causes a whole-ear signalling process that provokes abortion of youngest ovaries after a given time, as it is the case for example in pea (Guilioni *et al.*, 1997). This signal remains unknown in maize but may imply cytokinines synthesized during the early development of grains needed for the development of starchy endosperm (Brugière *et al.*, 2003).

- *Two switches follow those presented here, namely abortion caused by carbon deprivation and lack of pollen,* as presented below.

The events described here occurred earlier than those classically considered to cause abortion

The view presented above appreciably differs from that proposed in Boyle *et al.* (1991) and in following papers (Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999; McLaughlin & Boyer, 2004). Consistently, the experimental protocol used in these papers avoided the two switches to abortion presented here.

- Water deficit only became noticeable two days after silk emergence in the studies of Zinselmeier *et al.* (1995a) and of McLaughlin *et al.* (2004), although water was withheld at silk

emergence. This has avoided the first switch involving silk arrest, which essentially occurred during the period elapsing from 8d before to 2d after silk emergence in our study.

- Silks were prevented from pollination after silk emergence and fertilized synchronously 5 or 6d after it in the same studies, thereby avoiding the second switch, as in the treatment with synchronous pollination in our study.

It is therefore logical that the series of studies following Boyle *et al.* (1991) concluded that the main switch to abortion is due to carbon limitation during the post-silking period. While our studies showed no clear evidence of a carbon starvation in ovaries until silk emergence, the first signs of them occurred 5d after silk emergence with symptoms that were qualitatively similar to those observed by McLaughlin *et al.* (2004) but with a lower degree of severity (Oury *et al.* submitted as companion paper). In particular, expression of invertases genes did not increase 5d after silk emergence in ovaries prone to abort while they did in ovaries developing into grains, in accordance with the studies of McLaughlin *et al.* (2004) and Qin *et al.* (2004).

Hence, a third switch to abortion would begin about 2d after silk emergence, date at which the water deficit began in the study of McLaughlin *et al.* (2004), taking into account that no signs of carbon deprivation was observed in our study at silk emergence (Oury *et al.* submitted as companion paper). The period of time with sensitivity of these processes to water deficit end when grain number becomes insensitive to water deficit; i.e. about 20d after silk emergence (Claassen & Shaw, 1970; Grant *et al.*, 1989). The carbon processes associated with this period of time are unlikely to have appreciably contributed to ovary abortion in our study in view of the timing of abortion, which ended 1-2d after silk emergence in water deficit. The partial maintenance of photosynthesis and the favourable ovary carbon status in our water deficit treatments are consistent with this conclusion (Oury *et al.* submitted as companion paper).

The last switch to abortion can occur in field under water deficit because of a reduced pollen availability at the time of silk emergence (Uribelarrea *et al.*, 2002; Westgate *et al.*, 2003; Fonseca & Westgate, 2005). A lack of pollen availability was avoided in our study because we ensured that silks were in contact with fresh pollen of well watered plants. This phase would encompass the period between anthesis and end of silk emergence.

Consequences for breeding for a reduced abortion rate, for phenotyping and modelling.

Reducing seed number under water deficit is an evolutionary process allowing plants to produce at least a few viable seeds so their alleles are not lost during dry years (Tardieu *et al.*, 2014). Farmers and breeders most often wish to reduce these protections because allele viability is usually not a major issue in agronomic conditions in which seeds can be produced in favourable conditions. They also wish to reduce them because farmers usually do not place plants in very dry scenarios involving a risk of total plant failure, so tolerance to mild or moderate drought scenarios is the main issue for agriculture in drought-prone environments (Tardieu, 2012; Harrison *et al.*, 2014). We therefore propose that silk growth and emergence are crucial processes to take into account in breeding because they occur in moderate stresses, whereas a maintained carbon supply to ovaries in water deficit might be less crucial because this maintenance is preserved in mild or moderate water deficits observed in the field. The comparison between four hybrids suggests that an appreciable genetic variability in silk growth and emergence may exist, with a larger sensitivity for the hybrid B73_h than for the other three studied hybrids.

Phenotyping silk growth and expansion is a difficult task at least at a throughput compatible with genetic analyses. Direct phenotyping of grain number is not fully satisfactory either because grain number per unit area involves earlier events such as plant emergence and early vigour, and other traits such as the number of rows per ear and of ovaries per row. High throughput phenotyping for silk growth might be feasible via image analysis. However, an alternative might emerge from the genetic correlation between silk growth and leaf growth proposed by our group. In particular, the quantitative trait loci (QTLs) for silk weight and for leaf elongation rate largely collocate in maize (Dignat *et al.*, 2013). Those for ASI, which reflect silk growth rate (Fuad-Hassan *et al.*, 2008) also largely collocate with QTLs of leaf elongation rate in plants subjected to water deficit (Welcker *et al.*, 2007) This results in the unexpected result that the sensitivity of grain number to water deficit in the field has a high genetic correlation with the sensitivity of leaf growth to water deficit measured in a phenotyping platform (Chapuis *et al.*, 2012). If these facts were confirmed in the next years, phenotyping for silk growth could be at least partly deduced from that of leaf growth under water deficit (Sadok *et al.*, 2007).

Finally, the results presented here potentially have a large impact on the modelling of grain abortion, most often unsatisfactory in crop models (Boote *et al.*, 2013). Instead of simulating

them as a result of plant carbon status, it would be possible to consider silk growth of ovary cohorts in a model, which is currently under way (Messina C and Hammer G personal communication).

Acknowledgements

This work was supported by the European Union project FP7-244374 (DROPS), and the Agence Nationale de la Recherche project ANR-08-GENM-003. Authors thank I Peironnenche, C Pequignot, J Soewarto for technical support, C Check and D Verney for silk counting, and V Nègre for video automaton.

Conclusion

Ces premiers résultats confirment notre hypothèse qui relie le déterminisme du nombre de grains à la dynamique d'émergence des soies. Ils ont montré :

- que la dynamique d'émergence des soies est fortement impactée par les déficits hydriques,
- que le nombre de soies émergées final rend compte des pertes de grains observées à travers une large gamme de production,
- et que le nombre de grains est défini par le nombre d'ovules fécondés rapidement après les premières fécondations, empêchant le développement de grain dans les ovaires apicaux dont l'émergence de la soie a été retardée par le déficit hydrique.

Ces résultats soulignent que l'avortement est le résultat d'une perturbation de la croissance des soies. Cependant quel est le processus responsable de cette réduction de croissance : l'hydraulique ou le métabolisme carboné de la plante ? Comme les soies montrent un faible potentiel d'ajustement osmotique sous déficit hydrique (Westgate & Boyer, 1985), il est possible que dans ces conditions leur croissance soit limitée par une assimilation carbonée réduite (Tang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010).

Afin de déterminer quel est le premier processus qui limite la croissance sous déficit hydrique, nous avons caractérisé le métabolisme carboné des différents organes de l'épi lors d'un déficit hydrique modéré où la photosynthèse est toujours effective.

Chapitre 3 : Moderate water deficit causes ovary abortion in maize without appreciable change in plant or ovary carbon status

Vincent Oury¹, Cecilio F Caldeira¹, Duyên Prodhomme², Yves Gibon², François Tardieu¹, Olivier Turc¹

¹ INRA, UMR759 Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux.
Place Viala, F-34060 Montpellier, France

² INRA, 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, F-33883 Villenave d'Ornon, France
Plateforme Métabolome Bordeaux, INRA-Bordeaux, F-33883 Villenave d'Ornon, France

Soumis à New Phytologist

Summary

- Grain abortion is widely believed to be caused by photosynthate deprivation in ovaries. We have tested the possibility that a moderate water deficit causes a carbon-independent abortion.
- The growth, concentrations and amounts of carbohydrates were measured in basal and apical ovaries, silks and leaves of well watered or droughted plants at four dates around silk emergence. The activities and transcripts levels of major enzymes involved in carbon metabolism were measured in the same organs and dates.
- A moderate water deficit (WD) for ten days after tassel emergence reduced grain number by 51%, affected photosynthesis by 28% and did not affect leaf carbon status nor the activity of enzymes involved in carbon export. A moderate decrease in ovary growth in WD became irreversible in apical ovaries that eventually aborted but was reversible in non-aborting basal ovaries. The concentrations of sucrose, hexose and starch were unaffected in all ovaries at that time. Studied enzymes were essentially unchanged in all ovaries until silk emergence, consistent with the transcript abundances. Invertases activities and transcript abundances were affected 5d later in WD ovaries, probably a consequence rather a cause of the decrease in ovary growth.
- These results suggest that ovary abortion was carbon independent.

Key words: Abortion, water deficit, invertase, carbohydrates, ovary, silk, grain, maize

Introduction

Water deficit largely affects yield, with a maximum effect during flowering time in several species (Lilley & Fukai, 1994; Saini & Westgate, 1999; Rapoport *et al.*, 2012). It reduces grain number via either pollen viability or ovary abortion, depending on species and drought scenarios (Saini & Westgate, 1999; Rapoport *et al.*, 2012). In maize, the pollen viability is not significantly decreased under drought and usually does not account for yield losses (Herrero & Johnson, 1981; Schoper *et al.*, 1986, 1987). Conversely, the development of the (female) ear is very sensitive, with a delay of silk emergence and frequent abortions of ovaries or young grains (Boyer & Westgate, 2004).

It is widely believed that carbon availability is the main cause of ovary abortion in maize. This is based on a series of results showing that sucrose feeding can partly reverse the effect of water deficit on abortion (Boyle *et al.*, 1991; Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999; McLaughlin & Boyer, 2004). These experiments had a common protocol in which a water deficit imposed for six days following silk emergence caused a drastic reduction in photosynthesis and starch depletion in ovaries (Zinselmeier *et al.*, 1999). The sucrose flux to ovaries decreased to near-zero values but was partly restored upon sucrose feeding (Mäkelä *et al.*, 2005). Cell wall invertases, whose expressions increased after fertilization in ovaries of well watered plants, kept low expressions under water deficit (Zinselmeier *et al.*, 1995c, 1999; McLaughlin & Boyer, 2004). This has led several authors to consider cell wall invertases, in particular *Incw2*, as sensors of sucrose availability to ovaries (Boyer & McLaughlin, 2007; Ruan *et al.*, 2012).

Several arguments have led us to question the generality of the mechanisms leading to ovary abortion evidenced in the above experiments.

- A decrease in carbon availability to plants via severe plant shading, during the same 5-d time window as in the above protocols, has no clear effect on ovary abortion in spite of a near-zero photosynthesis (Schussler & Westgate, 1994, 1995; Zinselmeier *et al.*, 1995b; Hiyane *et al.*, 2010).
- The stress level in the protocols presented above (Boyle *et al.*, 1991 and further studies) was much more severe than those observed in most fields. In particular, photosynthesis and plant transpiration were nearly arrested and soil water reserve was nearly depleted. Water deficit observed in field conditions are most often less severe than those applied in pot experiments on

adult plants (Passioura, 2006; Poorter *et al.*, 2012; Tardieu, 2012). Photosynthesis is partly maintained in the field at least during morning hours and soil water reserve is rarely depleted in most frequent drought scenarios. In scenarios with moderate water deficit, carbon availability to growing organs is usually increased in several species (Hummel *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2011; Pantin *et al.*, 2013). Furthermore, ovary abortion has been observed in the field whereas sucrose availability to ovaries staid at high level (Andersen *et al.*, 2002).

- The pattern of pollination is sequential in the field, with silks pollinated as and when they emerge from the husks, while it was synchronous, with pollination of all silks at once 5-6d after first silk emergence in the experiments presented above. The pattern of abortion also differed, with a massive and randomly distributed abortion on the ear in the above experiments (Fig. 1-7, contrasting with an abortion located at the ear apex in most cases in the field Fig. 1-3)

We have therefore tested the hypothesis that a moderate water deficit during sequential pollination can cause a carbon-independent ovary abortion. The terminal distribution of ovary abortion in field grown plants has led us to hypothesize that, in moderate scenarios of water deficit, developmental processes may have an appreciable effect on ovary abortion regardless of carbon availability to ovaries. This paper presents evidences for high abortion rate in a moderate water deficit, although the time courses of photosynthesis, sugar concentrations, enzyme activities and transcript abundances during the water deficit suggested preserved sugar availability to ovaries. A companion paper (Oury *et al.*, submitted) presents alternative mechanisms based on ear and silk development.

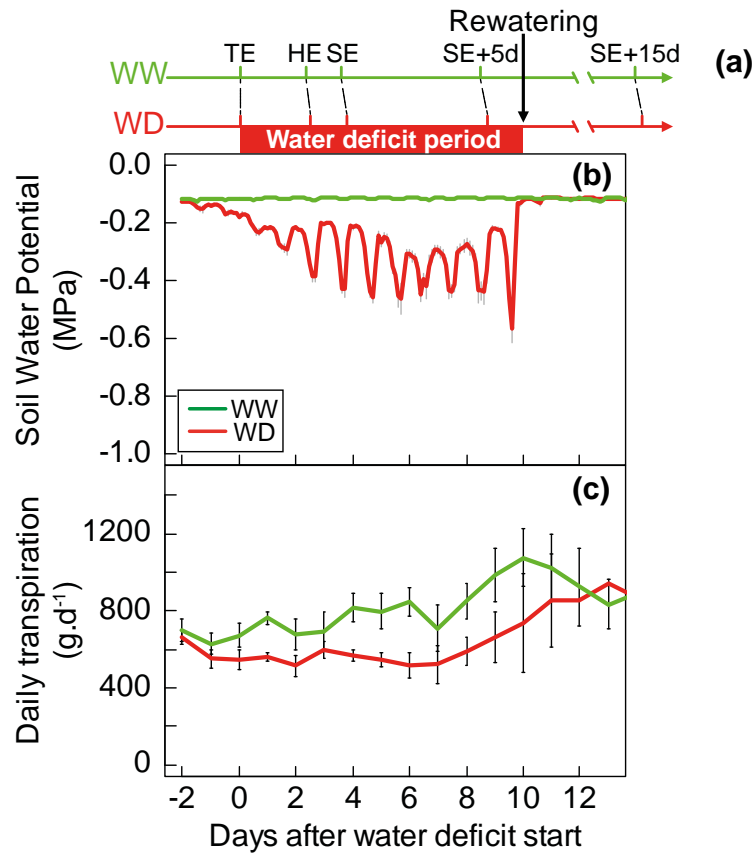


Figure 3-1 Time course of sampling (a), soil water potential (b) and daily transpiration (c) during the period of water deficit. In (a) TE, tassel emergence (and beginning of water deficit); SE, silk emergence, SE+5d and SE+15d, 5 and 15 days after silk emergence respectively. Error bars, 95% confidence interval ($n \geq 3$).

Material and methods

Plant materials and growth conditions

The maize hybrid B73xUH0007 was grown in a greenhouse in 9L cylindrical plastic pots at a plant density of 3 plant.m⁻². Three seeds per pot were sown in compost composed of clay and peat 30:70 v/v enriched in minerals. Plants were thinned to one per pot at the 2-leaf stage. Each pot was placed on a balance which allowed quantifying plant transpiration and calculating soil water content from pot weight, corrected by estimated plant weight, estimated by regularly sampling plants (Caldeira *et al.*, 2014). All plants were maintained at a soil water potential (Ψ_p) above -0.11MPa by daily irrigation, except for a short period around flowering for plants in water deficit (WD) treatment (Fig. 3-1b). At tassel emergence, recorded individually in each plant, water was withheld for 2 days until soil water content reached the desired soil water potential (Fig. 3-1b). Pots were then watered to $\Psi_p = -0.3$ MPa (see Caldeira *et al.* (2014) for detail of the method). Soil water potential decreased during the day and reached -0.5 MPa. Water deficit plants were re-watered at the level of well-watered treatments 6 days after silk emergence. Mean temperature and vapor pressure from tassel emergence to 6d after silk emergence were 25.4°C and 1.7 kPa during the day, and 21.8°C and 1.2 kPa during the night.

Photosynthesis measurements

Photosynthesis measurements were performed on plants grown in growth chamber under stable climatic conditions close to average values experienced in greenhouse and to the water deficit presented above. Photosynthesis was followed from 3 days after tassel emergence until 5 days after silk emergence on the ear leaf (leaf number 10 or 11) with a CIRAS-2 portable gas exchange system (PP Systems, Amesbury, MA, USA) with a 2.5cm² leaf chamber and an air flow rate of 300cm³.s⁻¹. Light intensity was similar in the greenhouse at leaf level and in the gas exchange system (300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Air temperature and vapour pressure deficit in the leaf chamber unit of CIRAS-2, also mimicked the environmental conditions in of greenhouse, i.e. 25°C and 1.5kPa. Measurements were carried out for the whole photoperiod (16 h) (n= 4 and 17 respectively in WW and WD treatments).

Table 3-S1 Maize gene ID used to identify the invertase and the sucrose synthase class of genes in maize ovary.

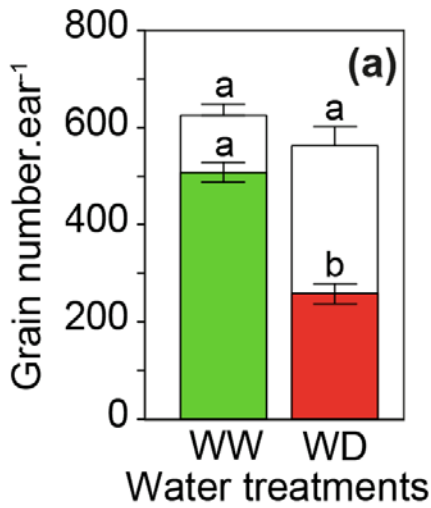
Maize ID	Enzymes	Class
GRMZM2G394450	Vacuolar invertase	Inv1
GRMZM2G089836	Vacuolar invertase	Inv2
GRMZM2G139300	Cell-wall invertase	Incw1
GRMZM2G119689	Cell-wall invertase	Incw2
GRMZM2G123633	Cell-wall invertase	Incw3
GRMZM2G174249	Cell-wall invertase	Incw4
GRMZM2G115451	Neutral invertase	Inn1
GRMZM2G007277	Neutral invertase	Inn2
GRMZM2G118737	Neutral invertase	Inn3
GRMZM2G089713	Sucrose synthase	SH1
GRMZM2G152908	Sucrose synthase	sus1
GRMZM2G318780	Sucrose synthase	sus2

Plants sampling and measurements

Ears were sampled at husk emergence, silk emergence, 5 days after silk emergence just before re-watering, and 15 days after silk emergence. At the first three sampling dates a sub sample of plants was harvested at the end of the day (before irrigation) and another sub sample was harvested 10-11h later at the end of the night. Leaf discs were sampled with a punch, frozen in liquid nitrogen and stored at -60°C. Ears enclosed in husks were cut from the plant and immediately dissected. Fresh weight of peduncle, ear and silks were immediately measured, before these organs were frozen in liquid nitrogen and stored at -60°C. Silks were sorted into 2 categories: basal silks inserted at positions 1-15 along ear row, and apical silks at upper positions. Ears were sliced in 6-7 sections, each of them including 5 ovary positions along ear rows (positions 1-5; 6-10; etc. counted from ear base). Ovaries and cob were separated in liquid nitrogen and weighed. 15 days after silk emergence, plants were sampled at the end of the day. Fresh weight of husks, peduncle, ear and silks were immediately measured, ears were photographed and ovary or grain number and dimensions were measured with the software IMAGE J®. Ovaries or grains volumes were estimated as in Oury *et al.* (submitted as companion paper).

Metabolite measurements

Metabolites were extracted as in (Hendriks *et al.*, 2003). Sucrose, glucose and fructose (Jelitto *et al.*, 1992), malate and fumarate (Nunes-Nesi *et al.*, 2007), total amino acids (Bantan-Polak *et al.*, 2001), proline (adapted from Troll & Lindsley, 1955; see also <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=Extraction+and+determination+of+proline>) were determined in the ethanolic supernatant. Starch (Hendriks *et al.*, 2003) and total protein (Bradford, 1976) contents were determined on the pellet resuspended in 100 mM NaOH. Assays were prepared in 96 well microplates using Starlet pipetting robots (Hamilton, Villebon sur Yvette, France) and absorbances were read at 340, 570 or 595 nm in MP96 microplate readers (SAFAS, Monaco). Ovary metabolite content was measured in all ear sections described above. Sections 1 to 3 counted from ear base were used as replicates of basal ovaries, while sections 4 and above were replicates of apical ovaries.



WW WD
Water treatments

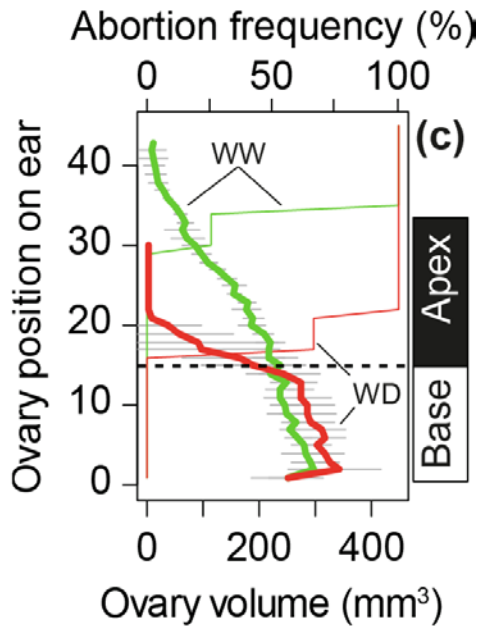


Figure 3-2 (a) Grain number per ear (colored bars) and number of ovaries per ear (empty bars), and (b) images of ears 15 days after silk emergence. (c) Ovary volume (thick lines) and abortion probability (thin lines) as a function of position along the ear 15 days after silk emergence. In (b) bar, 1cm. In (c) Dotted lines represent the frontier between basal and apical ovaries used in metabolomic analysis. Green, WW; red, WD. In (a) error bars, standard error ($n \geq 3$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$). In (c) error bars, 90% confidence interval ($n \geq 3$).

Enzyme activity measurements

Aliquots of 20 mg fresh weight (FW) were extracted as in Biais *et al.* (2014) and enzyme activities were measured according to Gibon *et al.* (2004, 2006, 2009, 2014), Sulpice *et al.* (2007) and Biais *et al.* (2014). Assays for neutral invertase and acid invertase were performed after desalting (PD MultitrapTM G-25, GE Healthcare). For the determination of cell wall invertase, pellets obtained after centrifugation of the extracts were washed 3 times by resuspension in 500 μ L extraction buffer without leupeptin, DTT and Triton X-100 followed by centrifugation (15 min, 4000 g). Cell walls were then washed in 300 μ L extraction buffer containing 1 M NaCl, leupeptin, DTT and Triton X-100 and vigorous shake for 5min in a Qiagen Tissue Lyser II. After centrifugation (15 min, 4000 g), cell wall invertase was measured in 5 μ aliquots of the supernatant of which 5 μ L was assayed with the same protocol as for acid invertase.

Water content and osmotic potential

Lyophilisation was used to estimate the dry matter content of aliquots and water content was calculated as the difference between fresh weight and dry weight. Osmotic potential was measured using by psychrometry. About 20 mg of frozen powder samples were put on ice until thawing. After centrifugation (15 min, 13000 rpm), cell fluid was collected and measured using a Roebling micro-osmometer (Type 13).

Transcript abundance measurements

Ovaries were sampled as described above at silk emergence and 5 days later in WW and WD plants of genotype B73 grown in growth chamber under stable climatic conditions close to average values experienced in greenhouse, and sorted into basal ovaries (positions 1-15 along the row) and apical ovaries (beyond). Expression levels of invertases and sucrose synthases were estimated with the oligonucleotide microarray Maïs 45K BGA (Roche NimbleGen) as described in Caldeira *et al.* (2014). Identification of invertase and sucrose synthase genes was performed on gramene.org (April 2014) (Table 3-S1).

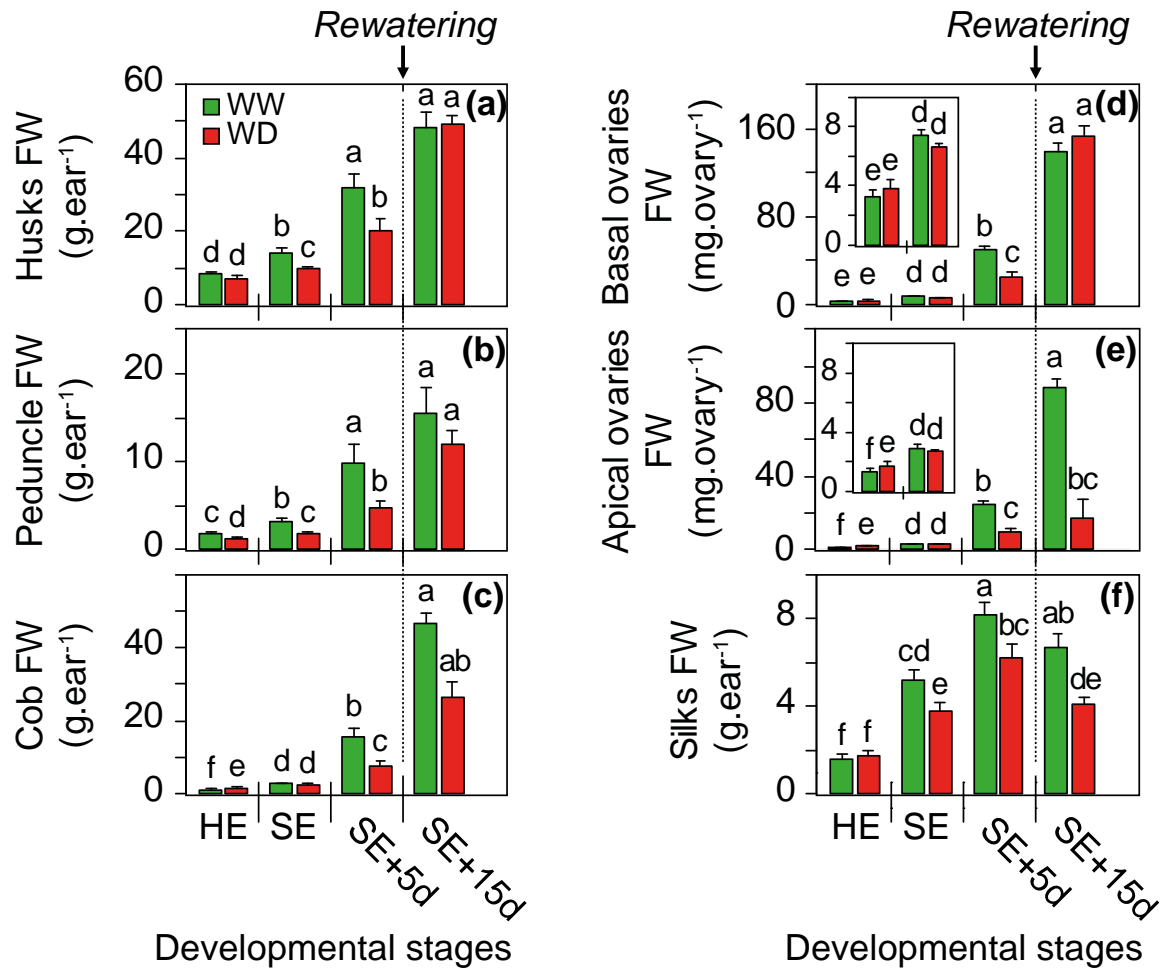


Figure 3-3 Fresh weights (FW) of husks (a), peduncle (b), cob (c), basal ovaries (d), apical ovaries (e), and silks (f) as a function of developmental stages. Green, WW; red, WD. HE, husk emergence; SE, silk emergence; SE+5d and SE+15d, 5 and 15 days after silk emergence respectively. Bars are means + standard error ($n \geq 6$ at HE, SE and SE+5d; $n \geq 3$ at SE+15d). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

Results

A transient water deficit during flowering time affected the growth of all reproductive organs, with an irreversible effect on ovaries located at the ear tip.

A water deficit imposed to plants for ten days, from tassel emergence to 6d after silk emergence (Fig. 3-1), caused a 49% loss of grain number (258 vs 508 grains per in WD and WW treatments, respectively, Fig. 3-2a). Abortion occurred at the tip of the ear (Fig. 3-2b,c) as in field studies (Fig. 1-3). Consistently, the water deficit imposed in this study was moderate, with a soil water potential oscillating from -0.2 to -0.5 MPa (Fig. 3-1b) and a plant transpiration reduced by 26% (769 vs 570 g.d⁻¹, Fig. 3-1c). It had no significant effect on ovary number per ear (Fig. 3-2a), so the reduction in grain number was due to ovary abortion. Pollen sterility was not involved either in the observed abortions because well-watered plants shedding pollen were distributed in the greenhouse during the whole period after silk emergence and hand-pollination was performed every day until the end of silk emergence. This represents an appreciable difference with the protocol of Boyle *et al.* (1991) and of further studies.

Water deficit affected the growths of ovaries and cobs relatively late during the water deficit period, namely 5 d after silk emergence (Fig. 3-3c,d,e). In contrast, the peduncle was already affected at husk emergence (i.e. two days before silk emergence, Fig. 3b), silks and husks were affected from silk emergence onwards (Fig. 3-3a,f). Hence, ovary growth was preserved until silk emergence regardless of plant water status. Over the five following days, it was affected by water deficit with similar effects in both basal and apical ovules, in such a way that the fresh weight was approximately half in apical vs basal ovaries of both WW and WD plants 5d after silk emergence (Fig. 3-3d,e). The growth of WD plants resumed after rewatering (6d after silk emergence) in all organs except apical ovaries, which had a near-zero growth over nine days. The growth arrest of apical ovules of WD plants was therefore irreversible. Conversely, basal ovaries grew rapidly in both treatments after rewatering, resulting in similar fresh weights 15 d after silk emergence. At this date, a high gradient of ovary volume was observed from the 15th to 20th positions on the ear in WD plants, nearly symmetrical to the frequency distribution of ovary abortion on the ear. This gradient was smoother in WW plants, with large ovaries till the 30th position on the ear, consistent with the gradient of abortion frequency that became appreciable from the 30th position onwards (Fig. 3-2c).

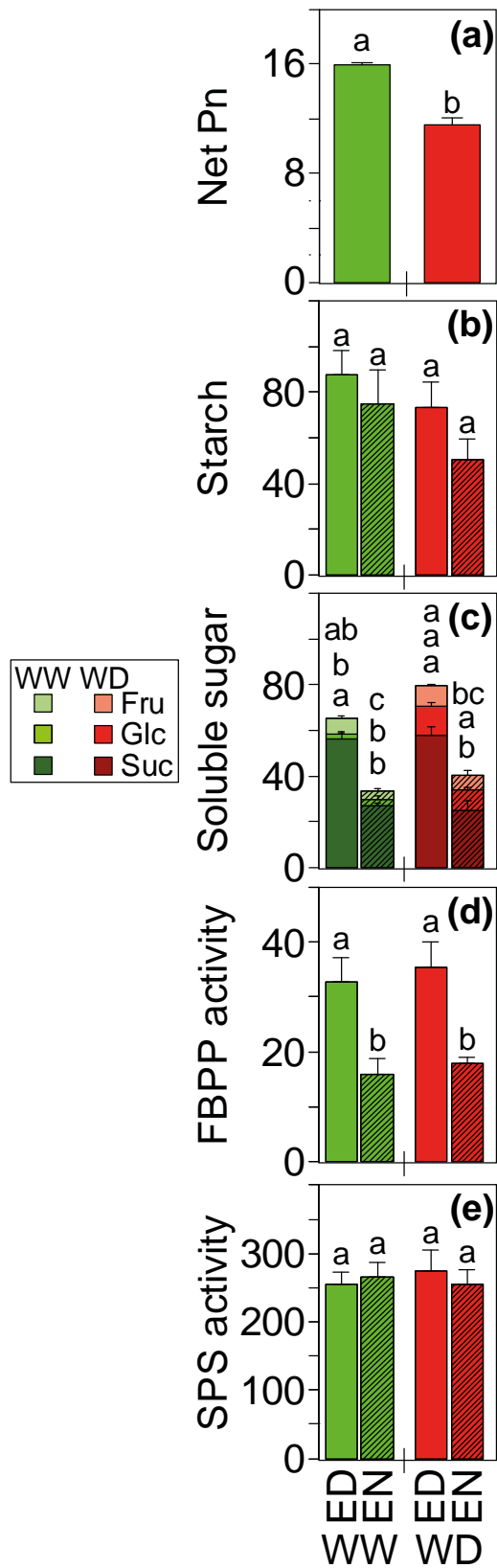


Figure 3-4 (a) Net photosynthesis (Pn, $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), mean values from 3 days after the beginning of water deficit to re-watering time (4d in WW and 17d in WD). (b) Starch and (c) soluble sugar content (sucrose (Suc), fructose (Fru), glucose (Glc) in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight). (d) Fructose 1,6-bisphosphatase (FBPP) and (e) sucrose phosphate synthase (SPS) activities ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteins). Green, WW; red, WD. Metabolite content and enzyme activities were measured at the end of the day (ED) and 10-11h later at the end of the night (EN). Bars are means + standard error ($n \geq 4$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

Taken together, these results suggest that the switch leading to ovary abortion in apical ovaries of WD plants was already triggered 6d after silk emergence, date at which plant water status fully recovered. Water deficit caused a reduction in growth before this date in both basal and apical ovaries, which was reversible in basal ovaries and irreversible in apical ovaries, with a transition at the 15-20th position on the ear. It is interesting to note that silk growth was affected by water deficit from silk emergence onwards, suggesting that silks may have a role in the switch to abortion (see also Oury *et al.*, submitted as companion paper).

The carbon export from source leaves was maintained in WD plants

The photosynthesis of the ear leaf was reduced by 28 % in the period of time elapsing from days 3 to 10 of the water deficit (Fig. 3-4a). No clear temporal tendency was observed for photosynthesis, metabolite contents and enzyme activities in leaves of WD plants, so results are presented in Fig. 3-4 as means calculated over 3 sampling dates, namely husk emergence, silk emergence and 5d after silk emergence. Sucrose content in leaves and the SPS activity, involved in sucrose synthesis for export, were maintained in WD plants at the same level as in WW (Fig. 3-4c,e). Hexose contents tended to be higher in WD than in WW leaves (Fig. 3-4c). The FBPP activity, involved in starch synthesis, was similar in WW and WD plants (Fig. 3-4d) although starch content was affected by water deficit by 20 % at the end of the light period and 30 % at the end of the dark period (Fig. 3-4b). This suggests that starch was metabolized more rapidly in WD plants, thereby contributing to maintain sucrose and hexoses concentrations. A higher mobilization of starch reserves in WD plants during the night, when plant water status partly recovered, sustained sucrose export to sink reproductive organs (Fig. 3-4b). Overall, these results show that sucrose export from source leaves was probably not appreciably affected in WD plants.

The concentrations of sugars were maintained or increased in reproductive organs of WD plants

The concentrations of starch, sucrose, glucose and fructose were measured in basal and apical ovaries, basal and apical silks and in cobs (Fig. 3-5a-d) at husk emergence, silk emergence and 5d after silk emergence. The total osmolyte content and the osmotic potential increased (resp. decreased) with water deficit in all studied organs (Fig. 3-5e-h). This occurred in ovaries before any response of fresh weight accumulation, suggesting a role for osmotic adjustment for growth

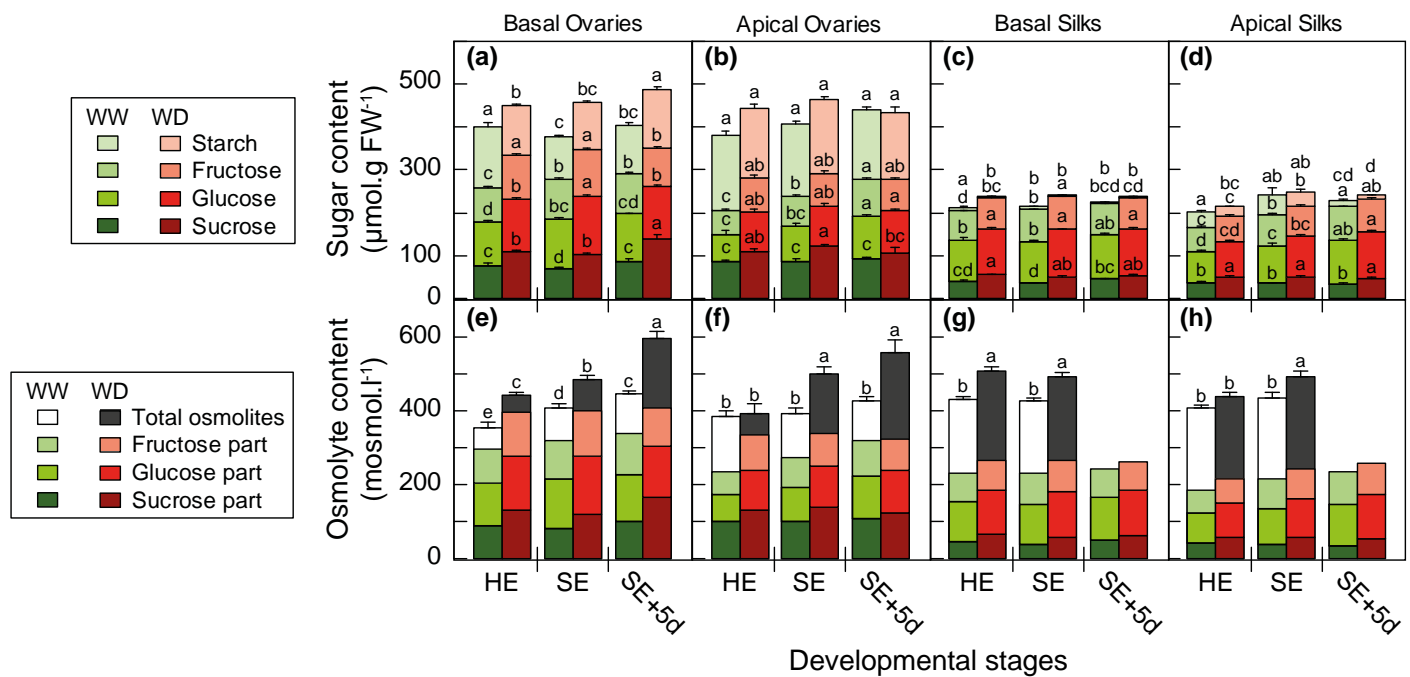


Figure 3-5 Sugar (sucrose, glucose, fructose and starch) content per unit fresh weight (FW) (top panel), and osmolyte content (lower panel) as a function of developmental stages in basal ovaries (a,e), apical ovaries (b,f), basal silks (c,g) and apical silks (d,h). Green gradient, WW; red gradient, WD. HE, husks emergence; SE, silk emergence; SE+5d, 5 days after silk emergence. Sugar and osmolyte content, means of samples harvested at the end of the day (ED) and 10-11h later at the end of the night (EN). Bars are means + standard error ($n \geq 6$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

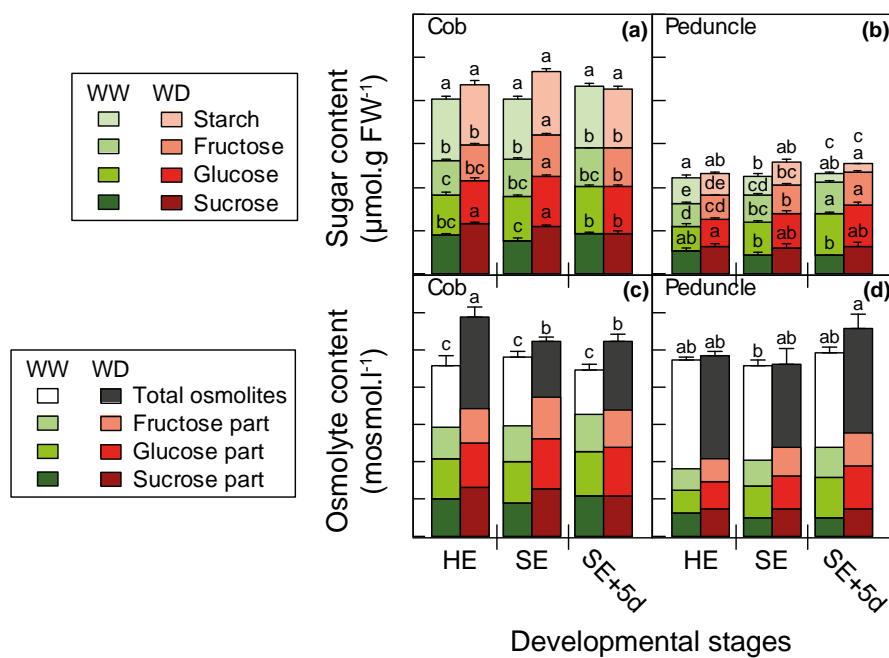


Figure 3-S6 Sugar (sucrose, glucose, fructose and starch) content per unit fresh weight (FW) (top panel), and osmolyte content (lower panel) as a function of developmental stages in cob (a, c), and peduncle (b, d). Green gradient, WW; red gradient, WD. HE, husks emergence; SE, silk emergence; SE+5d, 5 days after silk emergence. Sugar and osmolyte content, means of samples harvested at the end of the day (ED) and 10-11h later at the end of the night (EN). Bars are means + standard error ($n \geq 6$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

maintenance. Soluble sugars were the main component of osmolyte content, especially in ovaries and cobs (Fig. 3-5e-h).

Sucrose, glucose and fructose concentrations were at least equal in reproductive organs of WD compared with WW plants, regardless of dates and position on the ear (Fig. 3-5a-d). Water deficit significantly increased the sucrose concentration in ovaries and silks at both basal and apical positions and in the cob on the first two sampling dates, while no difference in growth rate were observable yet (Fig. 3-5a-d). Sucrose concentration was maintained in the peduncle, for which growth was reduced from the first sampling date onwards (Fig. 3-S6). Five days after silk emergence, the sucrose concentration continued to be equal or higher in studied reproductive organs of WD plants compared to WW plants. These trends also applied to glucose and fructose concentrations (Fig. 3-5a-d).

Starch content was not affected by water deficit, regardless of the growth rate of considered organs, except at the first sampling date in basal ovaries and silks in which growth was not reduced yet. The maintenance of starch storage in all reproductive organs during the whole period of water deficit suggests that carbon availability was not limiting.

The amounts of sugars per ovary or silk were only reduced after silk emergence without change in pattern of sugar amounts

The amounts of the same metabolites have been calculated in each organ from concentrations and fresh weights (Fig. 3-6a-e). The effect of water deficit on metabolite amounts closely followed the effect on concentrations on the first two sampling date because growth was marginally affected by water deficit for ovaries, silks and cobs at this time. The water deficit induced an accumulation of sucrose and maintenance of hexose and starch amounts per organ until silk emergence, indicating that the fluxes of photosynthates towards these organs were at least maintained during the early phase of water deficit. Five days after silk emergence, the amounts of all sugars were lower in WD than in WW plants in ovaries and silks, due to the drought-associated reduction in growth at this stage. This reduction of growth was not accompanied by a change in the pattern of sugar concentrations in WD plants in ovaries and silks, regardless of their position on the ear. In particular, the pattern of contents of different sugars was similar in apical and basal ovaries, indicating similar carbon status in spite of the putative switch to abortion in

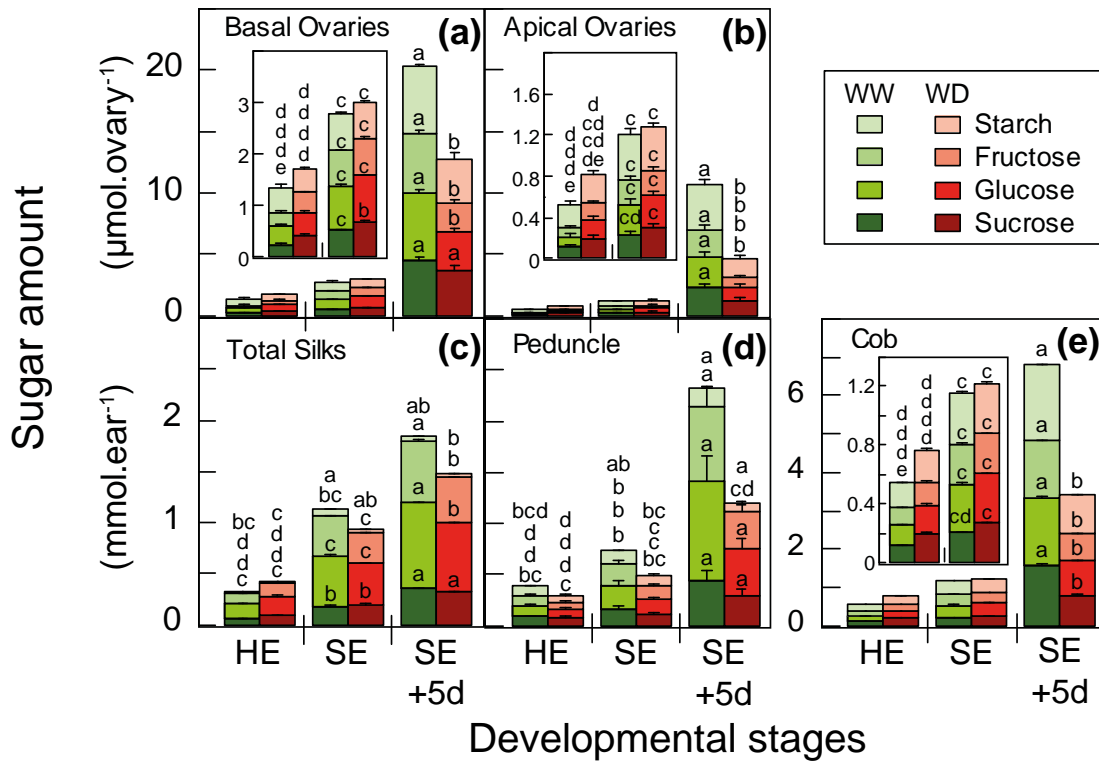


Figure 3-6 Sugar (sucrose, glucose, fructose and starch) amount per organ as a function of developmental stages in basal ovaries (a), apical ovaries (b), total silks (c), peduncles (d) and cobs (e) Green gradient, WW, red gradient WD. HE, husks emergence; SE, silk emergence; SE+5d, 5 days after silk emergence. Bars are means + standard error ($n \geq 6$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

apical but not basal ovaries. This suggests that the decrease in sugar amounts per organ probably followed, and not preceded, the reduction in expansive growth due to water deficit.

Water deficit caused limited changes in enzyme activities and transcripts abundance in ovaries

The SPS activity, involved in sucrose synthesis, was at least maintained under water deficit in all reproductive organs until 5d after silk emergence (significant increases at the first and third sampling dates except in silks, Fig. 3-7). This maintained or enhanced SPS activity in WD plants is consistent with the increase in sucrose content (Fig. 3-5a-d). The high level of SPS activity in WD plants therefore maintained sucrose availability for its cleavage by invertases and SuSy.

Activities and transcript abundances of Susy and cell wall invertases (CWI) were essentially unaffected by water deficit (Fig. 3-7), except in ovaries 5d after silk emergence. At that time, activities in apical ovaries significantly increased in well watered plants, while they did not in WD plants. The same trend, but amplified, was observed for transcript abundance of CWI (Fig. 3-8) which showed no difference between ovary position and water treatment at silk emergence, and a rapid increase in transcript levels at silk emergence + 5d except in apical ovaries of WD plants. It is noteworthy that the development of embryo had begun at this last date in apical ovaries of well watered plants, while it was stopped in apical ovaries of WD plants. The increase in SuSy and CWI activities could therefore follow, and not induce, embryo development.

Changes with time and between organs in vacuolar (VI) and neutral (NI) invertase activities (Fig. 3-7) paralleled those of growth in WD plants (Fig. 3-3). Activities were significantly reduced by WD at the first sampling date in peduncle and silks, but only at the last sampling date in ovaries and cobs. VI activity was significantly correlated with the relative growth rate of organ fresh weight at pollination (Fig. 3-9). VI and NI activity significantly increased in all reproductive organs during the dark period, known to be favorable for expansive growth processes (Fig. 3-S2). The transcript abundances of VI and NI genes were consistent with enzyme activities in basal and apical ovaries at two sampling dates (Fig. 3-8), with no effect of water deficit in basal nor in apical ovaries at silk emergence. Five days later, the transcript levels were reduced by WD in basal (ns for NI) and apical (ns for VI) ovaries. Taken together, these results suggest that the activities of VI and NI invertases accompanied the decrease in growth of reproductive organs induced by the soil water deficit.

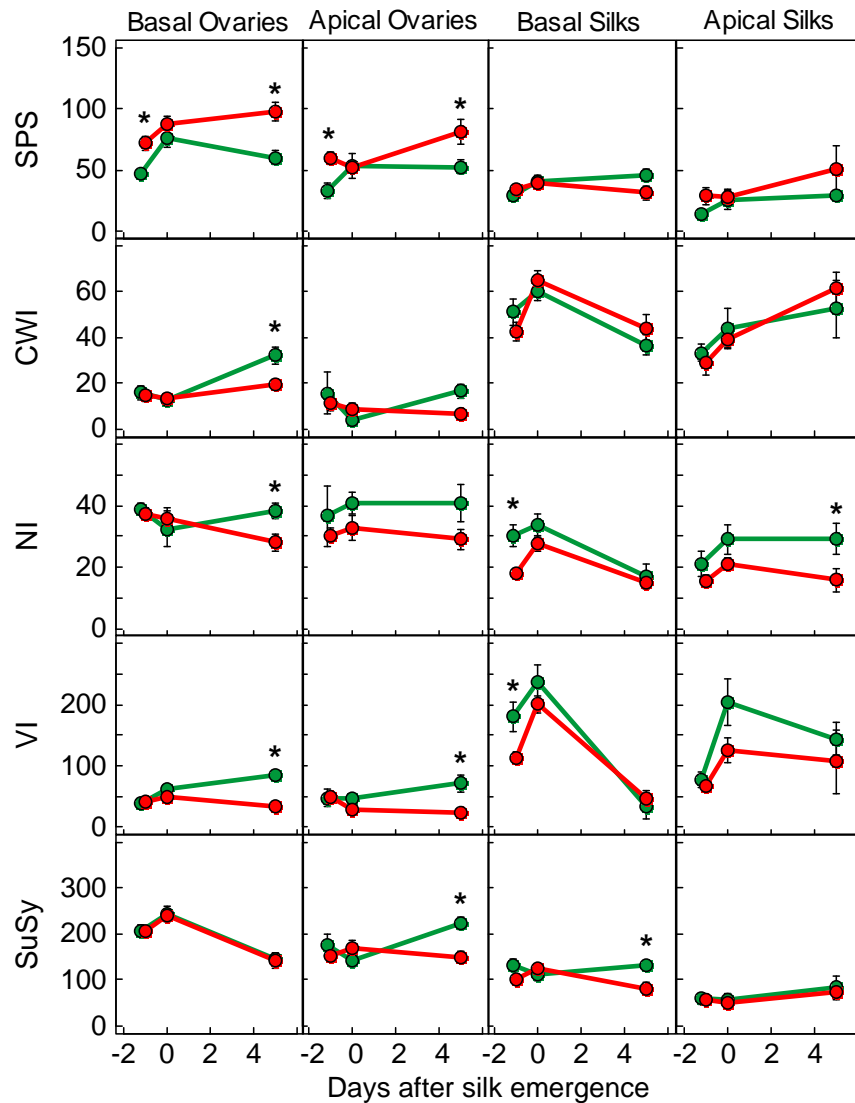


Figure 3-7 Times courses of enzymes activities in ovaries and silks. From top to bottom: sucrose phosphate synthase (SPS), vacuolar invertase (VI), neutral invertase (NI), cell-wall invertase (CWI) and sucrose synthase (SuSy) activities (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteins) in basal ovaries, apical ovaries, basal silks, and apical silks (from left to right) at 3 sampling stages in WW (green lines and points) or WD plants (red lines and points). Enzymes activities are means of samples harvested at the end of the day (ED) and 10-11h later at the end of night (EN). Error bars, standard error ($n \geq 3$). Stars, indicate significant differences in a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Discussion

Sink rather than source limitation of growth in reproductive organs under moderate water deficit

Reproductive organs were rapidly expanding during the studied period as indicated by growth in fresh weight and high hexose contents and acid invertase activities (both cell-wall and vacuolar) (Morris & Arthur, 1984; Sturm & Tang, 1999; Tang *et al.*, 1999; Kohorn *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2014). Water deficit reduced organ growth without altering their carbon status, in particular it induced soluble sugar accumulation and starch synthesis in all reproductive organs. This is consistent with numerous studies indicating that moderate water deficits induce a carbon satiation because expansive growth of sink organs is more affected than photosynthesis (Hummel *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2011; Pantin *et al.*, 2013). Hence, it can be considered that the growth in fresh weight was limited by expansive growth, involving water entry into cells and cell wall mechanical properties, rather than by carbon availability that is largely independent of expansive growth under water deficit (Hummel *et al.*, 2010; Pantin *et al.*, 2013; Tardieu *et al.*, 2014).

No trait involved in carbon metabolism could account for the abortion of apical ovaries, except the absence of increase in the activity and transcript abundance of cell wall invertases five days after silk emergence in ovaries with water deficit. The latter result is consistent with studies of Zinselmeier *et al.* (1995c, 1999) and of McLaughlin & Boyer (2004) who suggested that the differential behavior of cell wall invertases in well watered and water deficient plants causes abortion. However, both basal and apical ovaries showed this absence of increase in water deficit, but only apical ovaries aborted in our study while basal ovaries recovered after rewatering and developed into grains. Furthermore, a companion paper strongly suggests that the switch to abortion occurs one or two days after silk emergence in apical ovaries of water deficient plants (Oury *et al.* submitted). The differential behavior of cell wall invertases, not visible yet at silk emergence, would therefore occur after the switch to abortion. Finally, the mutation *miniature kernel*, which drastically reduces invertase activity in ovaries and disturbs the storage of carbohydrates in the endosperm, does not cause grain abortion (Miller & Chourey, 1992; LeClere *et al.*, 2010). We therefore suggest that the differential increases in invertase activity is a consequence and not a cause of on-going abortion in apical ovaries.

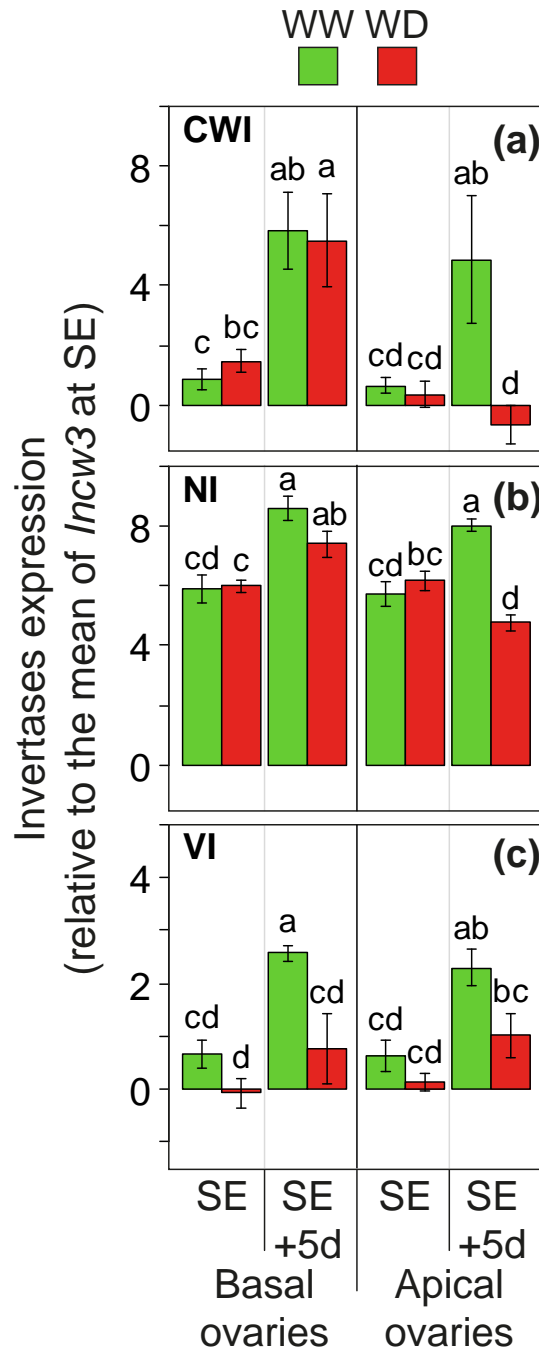


Figure 3-8 mRNA levels of invertase genes in ovaries at silk emergence and 5 days after silk emergence. Samples were collected at the end of the day. (a) Cell-wall invertases (CWI) are the sum of mRNAs measured for genes *Incw1*, *Incw2*, *Incw3*, and *Incw4*. (b) Neutral invertases (NI) are the sum of mRNAs measured for genes *Inn1*, *Inn2*, and *Inn3*. (c) Vacuolar invertases (VI) are the sum of mRNAs measured for genes, *Inv1* and *Inv2*. Green, WW; red, WD. Data are means \pm standard error ($n=3$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). Means of each gene used are presented in Fig 3-S7, together with the transcripts corresponding to other enzymes (sucrose synthase).

Vacuolar invertase activity as an indicator of expansive growth rate under water deficit

The companion paper of this study (Oury *et al.* submitted) suggests a major role for silk growth in the abortion of apical ovaries under water deficit. The experiment presented here is consistent with this conclusion by showing an early decrease in silk growth in water deficit before any effect on ovary growth. Consistently, the effect of water deficit on vacuolar invertase activity was observed five days earlier in silks than in ovaries and was already visible at silk emergence. Furthermore, the activity of vacuolar invertase was higher at the end of the night than at the end of the day (Fig. 3-S2g), i.e. followed the time course of expansive growth (with maximum rates in the night, Tardieu *et al.*, 2014) and not that of photosynthesis (with maximum rates in the day). These differential behaviours suggest that vacuolar invertases followed expansive growth in our experiments. High activities of vacuolar invertases are associated with rapid elongation in organs such as epicotyl of pea, roots of *Arabidopsis thaliana*, cotton fibers or maize roots and silks (Morris & Arthur, 1984; Xu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2010), whereas decreasing the vacuolar invertase activity causes decreased organ and cell sizes (Kohorn *et al.*, 2006).

Taken together, these arguments lead us to propose that the time course of vacuolar invertase activity in ovules and silks was not linked to changing sucrose availability but to expansive growth, itself linked to the flux of water into growing cells and to cell wall mechanical properties (Cosgrove, 2005). The early effect of water deficit on vacuolar invertase activity in silks at silk emergence would therefore reinforce the conclusion that silk growth was a major process involved in ovary abortion (Oury *et al.* submitted as a companion paper).

A carbon-independent process associated to sequential emergence of silk cohorts

The mechanisms leading to ovary abortion probably differed in this study compared with those observed in the series of pot experiments by Boyle *et al.*, (1991) and following studies (Zinselmeier *et al.*, 1995a, 1999; McLaughlin & Boyer, 2004).

- The ovary carbon status differed, with a cessation of the sucrose flux towards ovaries and starch depletion in ovaries in (Zinselmeier *et al.*, 1999), vs a maintained starch storage, maintained sucrose and hexose contents in ovaries and maintained sucrose and starch contents in leaves in our study.

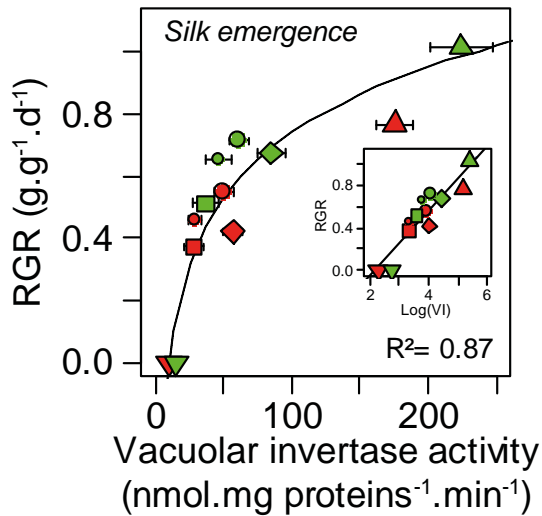


Figure 3-9 Relationship between vacuolar invertase (VI) activity and relative growth rate (RGR) of organs, at silk emergence. Green, WW; red WD. Big circles, basal ovaries; small circles, apical ovaries; diamond, cob; square, peduncle; triangles, silks; reverse triangles, leaf. Error bar, 95% confidence interval ($n \geq 3$). The organ relative growth rates (RGR) between husk emergence (t_1) and silk emergence (t_2) were calculated from the average fresh weight measured at t_1 (FW1) and t_2 (FW2): $RGR = (FW2/FW1)/(t_2 - t_1)$.

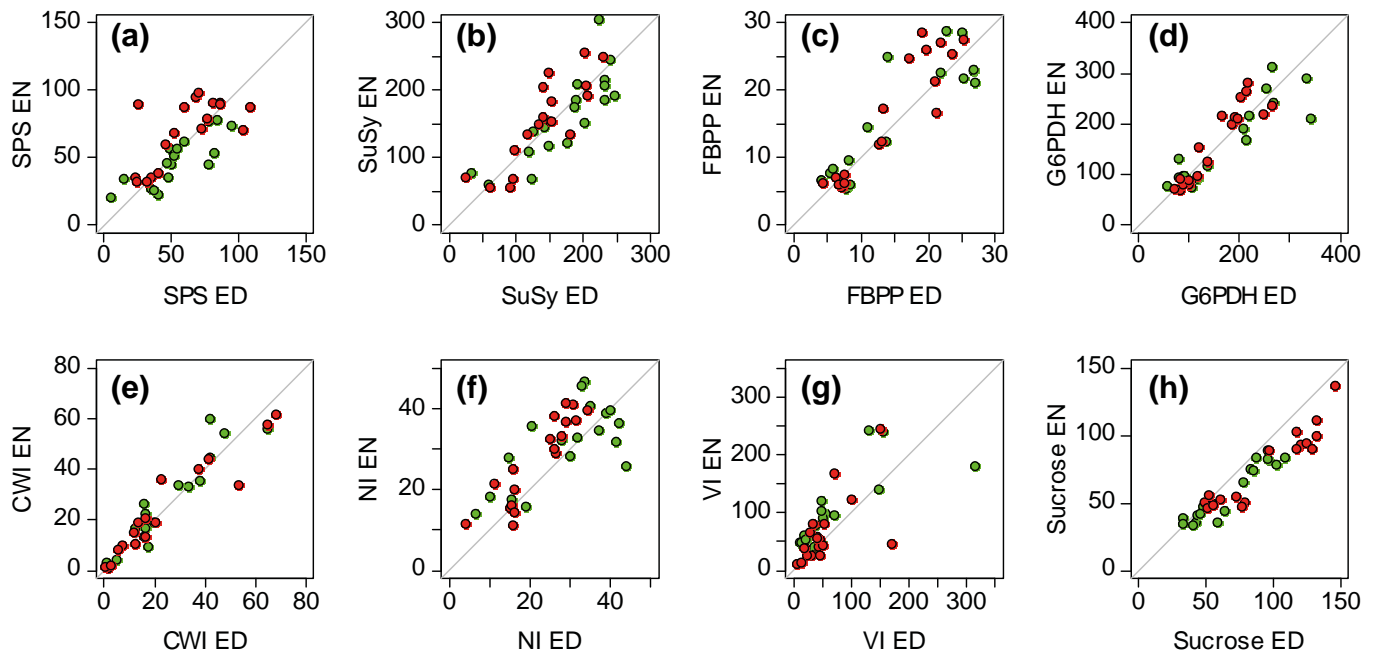


Figure 3-S2 Relationship between activities or content measured at the end of the day (ED) and at the end of the night (EN). (a) Sucrose phosphate synthase (SPS), (b) Sucrose synthase (SuSy), (c) Fructose 1,6-biphosphatase (FBPP), (d) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), (e) Cell-wall invertase (CWI), (f) Neutral invertase (NI), (g) Vacuolar invertase (VI), and (h) Sucrose content. Green, WW; red, WD. Activity are $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg proteins}^{-1}$ and content are $\mu\text{mol.g fresh weight}^{-1}$. In (g) the 2 points with higher VI activity in ED are basal silks 5 days after silk emergence, probably because these silks began senescent during the night of 5th days.

- The distribution of abortion clearly followed a base-apex gradient in our study vs random in the above-mentioned studies. This distribution is consistent with that observed in experiments involving asynchronous pollination, suggesting a role for a developmental process.
- The decrease in silk growth preceded any event associated with carbon status of apical ovaries, suggesting a switch to abortion as early as silk emergence. Taken together, this leads us to propose that a switch to abortion occurs during the period of sequential silk emergence and pollination in plants under water deficit. The analysis presented here suggests that it was not mainly triggered by carbon deprivation. Conversely, when water deficits occur after the period of sequential pollination or/and when sequential pollination is avoided through late synchronous pollination, abortion would involve sugar deprivation and cell wall invertases in young ovaries or grains.

This study therefore confirms the categories of abortion proposed in its companion paper (Oury *et al.* submitted). In addition to a possible lack of viable pollen to silk, this would involve two major processes and periods. (i) A period with ovary and silk sensitivities involving developmental process in the ear, namely the time courses of silk emergence and of ovule fertilization between tassel emergence and 1-2d after silk emergence in water deficit. These mechanisms were avoided in Zinselmeier's studies in which pollination occurred at a single date and water deficit began to be visible two days after silk emergence. (ii) A carbon dependent period of sensitivity of the young grain that would begin about 5d after silk emergence and end when grain number becomes insensitive to water deficit, 20d after silk emergence (Claassen & Shaw, 1970; Grant *et al.*, 1989). The sucrose flux to young grains and enzymes linked to sucrose cleavage would be involved in this phase, in our experiments as well as in Zinselmeier's. Carbon-related mechanisms occurring at this stage could explain the correlation between grain number and whole-plant and/or ear relative growth rates calculated during flowering time in field experiments with water deficit, shading or defoliation (Jacobs & Pearson, 1991; Andrade *et al.*, 1999, 2002; Vega *et al.*, 2001).

It is interesting to note that the time window with a maximum sensitivity to water deficit has shifted with generations of breeding, from the period post- flowering time in oldest genotypes to an earlier period in more recent genotypes (Bruce *et al.*, 2002). The respective roles of the two categories of mechanisms presented above may therefore have shifted with selection.

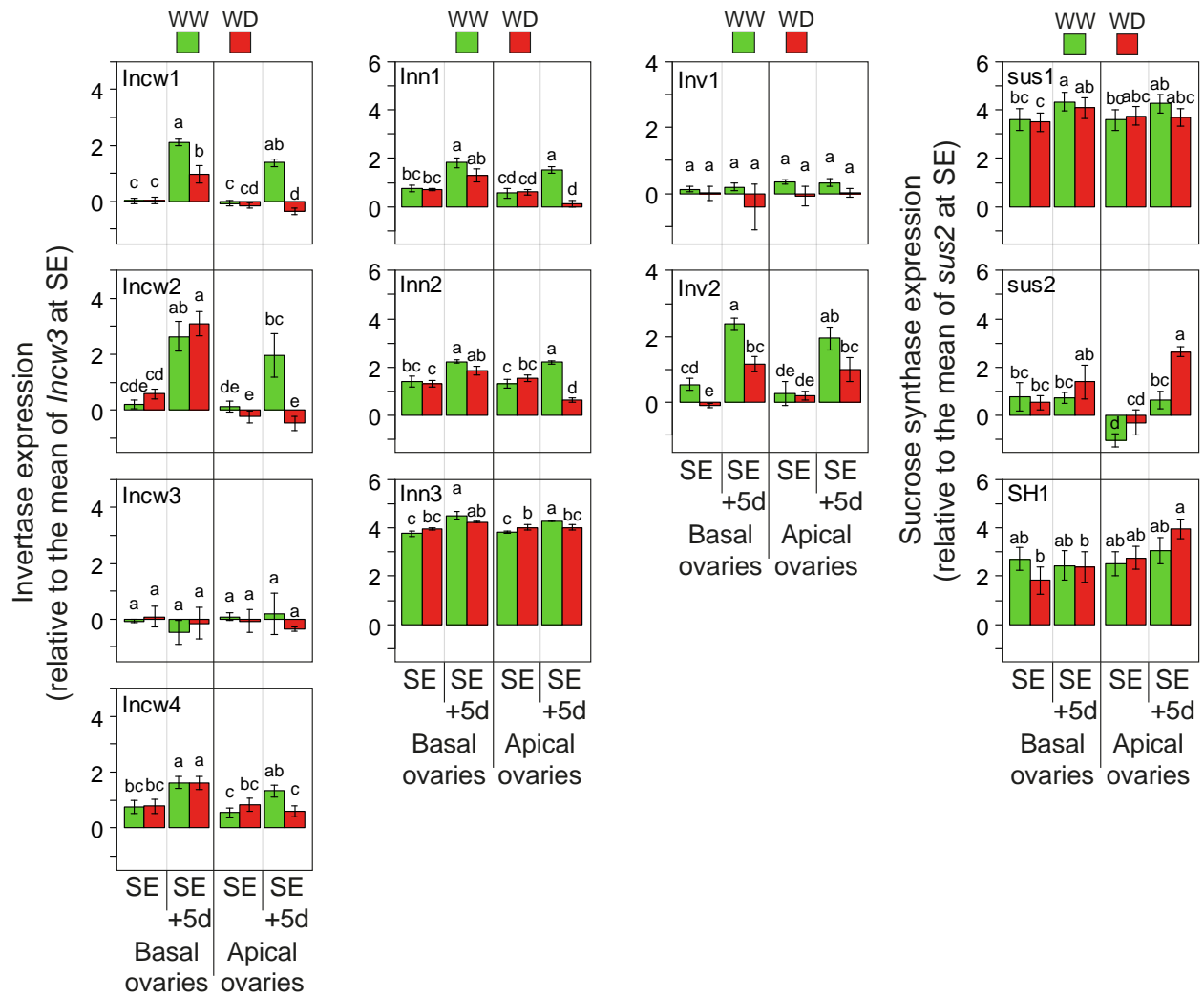


Figure 3-S7 mRNA levels for genes of sucrose processing enzymes in ovaries at silk emergence and 5 days after silk emergence. Samples were collected at the end of the day. Cell-wall invertase 1 (*Incw1*), cell-wall invertase 2 (*Incw2*), cell-wall invertase 3 (*Incw3*), cell-wall invertase 4 (*Incw4*), neutral invertase 1 (*Inn1*), neutral invertase 2 (*Inn2*), neutral invertase 3 (*Inn3*), vacuolar invertase 1 (*Inv1*), vacuolar invertase 2 (*Inv2*), sucrose synthase 1 (*sus1*), sucrose synthase 2 (*sus2*), shrunken1 (*SH1*). Green, WW; red, WD. Data are means \pm standard error ($n=3$). Different letters indicate significant differences in a Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

Acknowledgements

This work was supported by the European Union project FP7-244374 (DROPS), and the Agence Nationale de la Recherche project ANR-08-GENM-003. Authors thank M Bosio, JP Pichon, A Clementi and S Praud (Biogemma) for their contributions to the transcriptome analysis, I Peironnenche, M Dausat and S Berthézène for technical support.

Conclusion

L'analyse des quantités et concentrations en métabolites, des activités enzymatiques et de l'abondance de transcrits dans les organes reproducteurs pendant un déficit hydrique ont montré l'absence de lien entre l'avortement des ovaires et leur métabolisme carboné. L'avortement des ovaires apicaux est apparu consécutif à la perturbation de la croissance des soies qui a modifié leur cinétique d'émergence. Ce sont donc des processus liés aux mouvements d'eau dans la plante, largement indépendants du métabolisme carboné (Hsiao & Acevedo, 1974 ; Pantin *et al.*, 2013) qui ont été à l'origine de l'avortement des ovaires apicaux en déficit hydrique.

Chapitre 4 : Discussion générale

4.1. Le rôle central de la croissance des soies dans le déterminisme du nombre de grains chez le maïs en déficit hydrique

Lors de déficits hydriques pendant la floraison du maïs, la première réponse observée a été une réduction de la croissance des soies. Cette réponse a été mise en évidence, dans ce travail, dès l'émergence des premières soies, par la réduction de la biomasse des soies et la réduction de l'activité des invertases vacuolaires, enzymes associées à l'élongation cellulaire (Wang *et al.*, 2010). Un arrêt simultané de la croissance de toutes les soies a été observé en déficit hydrique peu après l'émergence des premières soies.

La réduction de la croissance des soies a des conséquences directes sur la mise en place du nombre de grains *via* 4 « points de contrôle » :

- ***le synchronisme de floraison mâle-femelle.*** L'intervalle floraison mâle-floraison femelle (ASI) dépend directement de la croissance des soies (Fuad-Hassan *et al.*, 2008). L'effet d'un déficit hydrique sur l'allongement de l'ASI est largement décrit dans la bibliographie, et peut provoquer des pertes de grains par non-pollinisation (absence de pollen viable au moment de la sortie des soies). Les avortements observés dans ce travail ne dépendaient pas de ce processus, car toutes les soies émergées étaient quotidiennement pollinisées avec du pollen frais.

- ***la séquence d'émergence des soies détermine les organes « prioritaires »*** : la probabilité d'avortement d'un ovaire/grain augmente avec le retard de la pollinisation de sa soie. Au-delà d'un certain délai (pollinisation asynchrone), la pollinisation n'est plus efficace, traduisant probablement une diminution au cours du temps de la réceptivité de l'ensemble des ovaires de l'épi.

- ***le nombre d'ovules fécondables.*** Un arrêt rapide de la croissance de toutes les soies est observé en déficit hydrique 1 à 2 jours après l'émergence des soies, qui réduit fortement le nombre de soies émergées, et donc le nombre d'ovules fécondables.

- ***la réceptivité des soies.*** Une soie qui n'est plus en croissance n'est plus réceptive en raison de la rigidification des parois qui empêche la progression du tube pollinique (Kapu & Cosgrove, 2010). Lorsque toutes les soies arrêtent simultanément leur croissance en déficit hydrique, on peut donc supposer qu'il y a blocage de la croissance de tous les tubes polliniques dans les pistils (ovaire + soie) où la fécondation n'a pas encore eu lieu (pollinisation < 24h). Ceci

peut réduire le nombre d'ovules fécondés par rapport au nombre de soies émergées, en particulier en déficit sévère où l'arrêt de croissance des soies se produit dès le premier jour d'émergence (WD3 Exp 2).

Les avortements consécutifs à cet arrêt de croissance des soies concernent les organes apicaux, les derniers susceptibles d'être pollinisés. L'avortement des ovaires apicaux est cohérent avec l'hypothèse évolutive de *developmental selection*, où les organes qui avortent sont préférentiellement ceux dont le développement (croissance, métabolisme, etc.) est le moins performant (Buchholz, 1922; Wiens *et al.*, 1987; Snell-Rood, 2012).

L'ensemble de ces réponses explique la quasi-totalité des avortements observés lors d'un déficit hydrique pendant la floraison. Elles se produisent avant l'arrêt de croissance des ovaires et sont indépendantes du métabolisme carboné sous contrainte hydrique. La phase de sensibilité au carbone n'interviendrait qu'ensuite, en aval de ces réponses.

Les résultats obtenus dans ce travail nous amènent donc à revisiter les processus qui contrôlent le nombre de grains chez le maïs en déficit hydrique. L'avortement est généralement vu comme consécutif à un manque de fourniture carbonée à l'ovaire ou jeune grain. Nos résultats suggèrent au contraire que les avortements d'ovaires et jeunes grains pendant la floraison sont dus à l'impact du déficit hydrique sur les processus d'expansion cellulaire dans les soies, indépendamment de la disponibilité en carbone.

4.2. Perspectives pour la sélection : les leviers d'actions pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse du maïs

Les travaux de cette thèse suggèrent donc que le maintien de la croissance des soies est le levier prioritaire pour le maintien du nombre de grains produits sous déficit hydrique, et relativisent l'impact du métabolisme carboné. Les processus impliqués dans la croissance lors de déficit hydrique sont en premier lieu hydrauliques (Hummel *et al.*, 2010; Pantin *et al.*, 2013), soulignant que la tolérance de la floraison du maïs pourrait passer par le maintien de l'hydraulique de la plante et en particulier du flux d'eau disponible à la croissance en expansion.

Dans ce cadre deux voies peuvent être proposées pour le maintien du nombre de grains sous déficit hydrique. La première et la plus évidente au premier abord, passe par le maintien de

la croissance à travers une amélioration de la captation racinaire ou de l'efficacité de l'utilisation de l'eau par la plante. Mais ces traits limitent souvent le potentiel de production de la plante, par une redistribution plus importantes des ressources aux racines (amélioration de la captation racinaire), ou par une réduction des dimensions de la plante (amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'eau) qui diminue l'assimilation carbonée (Blum, 2005; Araus *et al.*, 2012; Tardieu, 2012). L'utilisation de ces traits n'est donc envisageable que pour des environnements où la contrainte hydrique est récurrente ou persistante, ce qui n'est pas le cas dans la plupart des aires de production agricole.

Le maintien de la croissance a pourtant montré des résultats concluants, car une grande partie du progrès dans le maintien du rendement sous déficit hydrique est due à la réduction de l'ASI (Edmeades *et al.*, 1993; Bolaños & Edmeades, 1993; Bruce *et al.*, 2002). Cependant les processus impliqués dans le maintien d'un ASI court ne sont pas encore clairement identifiés. La caractérisation d'un même QTL (*Quantitative Trait Locus*) pour le maintien de la croissance foliaire et de l'ASI lors de déficit hydrique (Welcker *et al.*, 2007), souligne que les processus impliqués sont partagés entre les feuilles et les soies. L'étude du maintien de la croissance foliaire du maïs est donc un moyen rapide (analyse réalisable dès les premières feuilles) et pertinent pour le maintien du rendement sous déficit hydrique. Cette démarche a déjà permis de souligner l'impact de la variabilité génétique sur l'efficacité de la croissance sous déficit hydrique (Welcker *et al.*, 2011). A terme, l'intégration des gènes impliqués dans le maintien de la croissance sous déficit hydrique dans les hybrides à fort potentiel de production permettra probablement une amélioration significative de la production de grains lors de sécheresse.

Une seconde voie peut être envisagée et passe par l'étude de l'impact de la variabilité génétique sur la dynamique d'émergence des soies ou la durée de réceptivité de l'épi. La variabilité génétique n'a pas été développée dans cette thèse, mais est l'une des prochaines étapes pour une meilleure compréhension de la biologie de reproduction du maïs. Cette étape est nécessaire pour observer comment le processus d'avortement évolue à travers des génotypes contrastés et comprendre comment se traduit la tolérance. Cependant l'étude de l'émergence des soies est limitée par le faible débit de l'énumération manuelle des soies, qui reste l'une des seules méthodes pour caractériser la floraison de l'épi (Araus *et al.*, 2012). Le développement de nouveaux outils de phénotypage basés sur des automates ou de l'imagerie permettront probablement à terme une caractérisation indirecte de l'émergence des soies.

4.3. Impact sur la modélisation du rendement du maïs sous déficit hydrique

La sélection variétale utilise aujourd'hui des simulations pour prédire le phénotype des plantes en fonction de différents environnements, afin d'estimer l'impact de gènes ou de traits phénotypiques ou fonctionnels sur le rendement. La simulation du rendement repose sur l'élaboration de modèles de culture qui formalisent le fonctionnement de la plante. Par exemple, l'assimilation carbonée de la plante est une fonction de sa surface foliaire, de l'efficacité de la photosynthèse, et du statut hydrique de la plante, où ce dernier définit la disponibilité en dioxyde de carbone à travers la conductance stomatique. La modélisation est limitée par la prédiction des traits adaptatifs complexes (Hammer *et al.*, 2010), comme la détermination du nombre de grains par exemple qui est un processus intégratif. La prédiction du nombre de grains est basée à l'heure actuelle sur le taux de croissance de la plante ou de l'épi à l'anthèse (floraison mâle) qui dans les modèles de prédiction du rendement est souvent fonction de l'assimilation carbonée de la plante à l'anthèse. Ainsi ces modèles montrent le plus souvent une prédiction insatisfaisante de l'avortement (Boote *et al.*, 2013).

Les résultats de cette thèse remettent en question ces modèles essentiellement basés sur l'assimilation carbonée, démontrant que lors de sécheresse le statut hydrique est le premier facteur qui limite le rendement. Ce résultat a déjà été intégré dans le modèle APSIM, qui détermine désormais le nombre de grains en fonction de la cinétique de croissance des soies de cohortes d'ovaires dans un premier temps, et de l'assimilation carbonée de la plante dans un deuxième temps.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de clarifier le déterminisme du nombre de grains sous déficit hydrique. Dans ces conditions l'avortement des ovaires apicaux est en premier lieu déterminé par la dynamique d'émergence des soies, laquelle est fortement modifiée par une contrainte hydrique en dépit d'un métabolisme carboné non limitant. La sensibilité de la floraison du maïs est apparue comme le résultat de la sensibilité de la croissance aux déficits hydriques. Le maintien de la croissance apparaît alors comme le premier levier de la sélection variétale pour le maintien des rendements lors de contraintes hydriques modérées qui n'ont que peu d'impact en dehors de la période de floraison (Claassen & Shaw, 1970; Araus *et al.*, 2012). Bien que cette thèse ait mis en lumière le mécanisme biologique qui mène à l'avortement des ovaires, le ou les mécanismes physiologiques sous-jacents restent encore indéfinis. De ce fait ce travail ouvre la porte à des études dans de multiples champs disciplinaires, comme la biologie fonctionnelle, la biologie moléculaire et l'écophysiologie, entre autres. Par ailleurs l'impact de la variabilité génétique demeure à quantifier pour la caractérisation des mécanismes de tolérance de la floraison du maïs à la sécheresse. Dans ce cadre, le développement et l'utilisation de nouveaux outils de phénotypage à haut débit, couplés à des analyses génétiques apparaissent comme une démarche pertinente pour la caractérisation des traits de tolérance et l'identification des processus physiologiques ou des gènes impliqués.

Références

- Andersen MN, Asch F, Wu Y, Jensen CR, Næsted H, Mogensen VO, Koch KE. 2002. Soluble Invertase Expression Is an Early Target of Drought Stress during the Critical , Abortion-Sensitive Phase of Young Ovary Development in Maize. *Plant physiology* **130**: 591–604.
- Anderson SR, Lauer MJ, Schoper JB, Shibles RM. 2004. Pollination Timing Effects on Kernel Set and Silk Receptivity in Four Maize Hybrids. *Crop Science* **44**: 464–473.
- Andrade F, Echarte L, Rizalli R, Della Maggiora A, Casanovas M. 2002. Kernel number prediction in maize under nitrogen or water stress. *Crop Science* **42**: 1173–1179.
- Andrade F, Vega C, Uhart S, Cirilo A, Cantarero M, Valentinuz O. 1999. Kernel number determination in maize. *Crop Science* **39**: 453–459.
- Araus JL, Serret MD, Edmeades GO. 2012. Phenotyping maize for adaptation to drought. *Frontiers in physiology* **3**: 305.
- Bantan-Polak T, Kassai M, Grant KB. 2001. A comparison of fluorescamine and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde fluorogenic reagents for microplate-based detection of amino acids. *Analytical biochemistry* **297**: 128–36.
- Bassetti P, Westgate ME. 1993a. Emergence, Elongation, and Senescence of Maize Silks. *Crop Science* **33**: 271–275.
- Bassetti P, Westgate M. 1993b. Senescence and receptivity of maize silks. *Crop Science* **33**: 275–278.
- Bassetti P, Westgate ME. 1994. Floral Asynchrony and Kernel Set in Maize Quantified by Image Analysis. *Crop Science* **34**: 699–703.
- Biais B, Bénard C, Beauvoit B, Colombié S, Prodhomme D, Ménard G, Bernillon S, Gehl B, Gautier H, Ballias P, et al. 2014. Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. *Plant physiology* **164**: 1204–21.
- Blum A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 1159–1168.
- Bolaños J, Edmeades GO. 1993. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. *Field Crops Research* **31**: 253–268.
- Bolaños J, Edmeades GO. 1996. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Fied Crops Research* **48**: 65–80.
- Boote KJ, Jones JW, White JW, Asseng S, Lizaso JJ. 2013. Putting mechanisms into crop production models. *Plant, cell & environment* **36**: 1658–1672.
- Bonnett OT. 1940. Development of the staminate and pistillate inflorescence of sweet corn. *Journal of Agricultural Research* **60**(1): 25-37.
- Boyer JS, McLaughlin JE. 2007. Functional reversion to identify controlling genes in multigenic responses: analysis of floral abortion. *Journal of experimental botany* **58**: 267–277.
- Boyer JS, Westgate ME. 2004. Grain yields with limited water. *Journal of experimental botany* **55**: 2385–2394.
- Boyle MG, Boyer JS, Morgan PW. 1991. Stem Infusion of Liquid Culture Medium Prevents Reproductive Failure of Maize at Low Water Potential. *Crop Science* **31**: 1246–1252.

- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248–254.
- Brown PJ, Upadaya N, Mahone GS, Tian F, Bradbury PJ, Myles S, Holland JB, Flint-Garcia S, McMullen MD, Buckler ES, et al. 2011.** Distinct genetic architectures for male and female inflorescence traits of maize. *PLoS genetics* **7**: e1002383.
- Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC. 2002.** Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of experimental botany* **53**: 13–25.
- Brugière N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu X, Jones RJ, Habben JE. 2003.** Cytokinin Oxidase Gene Expression in Maize Is Localized to the Vasculature , and Is Induced by Cytokinins , Abscisic Acid , and Abiotic Stress. *Plant Physiology* **132**: 1228–1240.
- Buchholz J. 1922.** Developmental selection in vascular plants. *Botanical gazette* **73**: 249–286.
- Caldeira CF, Bosio M, Parent B, Jeanguenin L, Chaumont F, Tardieu F. 2014.** A hydraulic model is compatible with rapid changes in leaf elongation rate under fluctuating evaporative demand and soil water status. *Plant Physiology* **in press**: DOI:10.1104/pp.113.228379.
- Campos H, Cooper M, Habben JE, Edmeades GO, Schussler JR. 2004.** Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research* **90**: 19–34.
- Cárcova J, Andrieu B, Otegui ME. 2003.** Silk Elongation in Maize : Relationship with Flower Development and Pollination. *Crop Science* **43**: 914–920.
- Cárcova J, Otegui ME. 2001.** Ear Temperature and Pollination Timing Effects on Maize Kernel Set. *Crop Science* **41**: 1809–1815.
- Cárcova J, Otegui ME. 2007.** Ovary Growth and Maize Kernel Set. *Crop Science* **47**: 1104–1110.
- Cárcova J, Uribe Larrea M, Borra L, Otegui ME, Westgate ME. 2000.** Synchronous Pollination within and between Ears Improves Kernel Set in Maize. *Crop Science* **40**: 1056–1061.
- Carillo P, Gibon Y, PrometheusWiki contributors. 2014.** Extraction and determination of proline. [WWW document] URL [http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=Extraction and determination of proline&preview=14](http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=Extraction+and+determination+of+proline&preview=14) [accessed 11 April 2014].
- Chapman SC, Edmeades GO. 1999.** Selection Improves Drought Tolerance in Tropical Maize Populations: II. Direct and Correlated Responses among Secondary Traits. *Crop Science* **39**: 1315–1324.
- Chapuis R, Delluc C, Debeuf R, Tardieu F, Welcker C. 2012.** Resiliences to water deficit in a phenotyping platform and in the field: How related are they in maize? *European Journal of Agronomy* **42**: 59–67.
- Cheng W-H, Chourey PS. 1999.** Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **98**: 485–495.
- Claassen MM, Shaw RH. 1970.** Water Deficit Effects on Corn. II. Grain Components. *Agronomy Journal* **62**: 652–655.
- Cooper M, van Eeuwijk F a, Hammer GL, Podlich DW, Messina C. 2009.** Modeling QTL for complex traits: detection and context for plant breeding. *Current opinion in plant biology* **12**: 231–240.

- Cosgrove DJ. 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**: 850–61.
- Denmead OT, Shaw RH. 1960.** The Effects of Soil Moisture Stress at Different Stages of Growth on the Development and Yield of Corn. *Agronomy Journal* **52**: 272–274.
- Dignat G, Welcker C, Sawkins M, Ribaut JM, Tardieu F. 2013.** The growths of leaves, shoots, roots and reproductive organs partly share their genetic control in maize plants. *Plant, cell & environment* **36**: 1105–1119.
- Dupuis I, Dumas C. 1989.** In vitro pollination as a model fo studying fertilization in maize (*Zea mays* L.). *Sexual Plant Reproduction* **2**: 265–269.
- Duvick DN. 2005.** The Contribution of Breeding to Yield Advances in maize (*Zea mays* L.). *Advances in Agronomy*. 83–145.
- Edmeades G, Bolaños J, Elings A, Ribaut J-M, Bänziger M. 2000.** The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In: Westgate ME, Boote K, eds. *Physiology and modeling kernel set in maize*. Madison, USA: Crop Science Society of America, 43-73.
- Edmeades GO, Bolaños J, Hernandez M, Bello S. 1993.** Causes for silk delay in a lowland tropical maize. *Crop Science* **33**: 1029–1035.
- Fonseca AE, Westgate ME. 2005.** Relationship between desiccation and viability of maize pollen. *Field Crops Research* **94**: 114–125.
- Freier G, Vilella F, Hall A. 1984.** Within-ear pollination synchrony and kernel set in maize. *Maydica* **29**: 317–324.
- Fuad-Hassan A, Tardieu F, Turc O. 2008.** Drought-induced changes in anthesis-silking interval are related to silk expansion: a spatio-temporal growth analysis in maize plants subjected to soil water deficit. *Plant, cell & environment* **31**: 1349–1360.
- Gibon Y. 2014.** Why bring post-genomics into the phosphorus-impooverished bush? *Plant, cell & environment* **37**: 1273–1275.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Ho M, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M. 2004.** A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays : Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *Plant cell* **16**: 3304–3325.
- Gibon Y, Pyl E-T, Sulpice R, Lunn JE, Höhne M, Günther M, Stitt M. 2009.** Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. *Plant, cell & environment* **32**: 859–874.
- Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M, Max A, Physiology P, Golm SP, et al. 2006.** Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. *Genome biology* **7**:R76
- Grant RF, Jackson BS, Kiniry JR, Arkin GF. 1989.** Water Deficit Timing Effects on Yield Components in Maize. *Agronomy Journal* **81**: 61–65.
- Guilioni L, Wery J, Tardieu F. 1997.** Heat Stress-induced Abortion of Buds and Flowers in Pea : Is Sensitivity Linked to Organ Age or to Relations between Reproductive Organs ? *Annals of Botany* **80**: 159–168.
- Hammer GL, van Oosterom E, McLean G, Chapman SC, Broad I, Harland P, Muchow RC. 2010.** Adapting APSIM to model the physiology and genetics of complex adaptive traits in field crops. *Journal of experimental botany* **61**: 2185–202.

- Harrison MT, Tardieu F, Dong Z, Messina CD, Hammer GL. 2014.** Characterizing drought stress and trait influence on maize yield under current and future conditions. *Global change biology* **20**: 867–878.
- Hendriks J, Kolbe A, Gibon Y. 2003.** -glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* **133**: 838–849.
- Herrero M, Johnson R. 1981.** Drought stress and its effects on maize reproductive systems. *Crop Science* **21**: 105–110.
- Hiyane R, Hiyane S, Tang AC, Boyer JS. 2010.** Sucrose feeding reverses shade-induced kernel losses in maize. *Annals of botany* **106**: 395–403.
- Hsiao T, Acevedo E. 1974.** Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. *Agricultural Meteorology* **14**: 59–84.
- Huang BQ, Sheridan WF. 1994.** Female Gametophyte Development in Maize: Microtubular Organization and Embryo Sac Polarity. *The Plant cell* **6**: 845–861.
- Hufford MB, Xu X, van Heerwaarden J, Pyhäjärvi T, Chia J-M, Cartwright R a, Elshire RJ, Glaubitz JC, Guill KE, Kaeppler SM, et al. 2012.** Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nature genetics* **44**: 808–811.
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, et al. 2010.** *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant physiology* **154**: 357–372.
- Jacobs B, Pearson C. 1991.** Potential yield of maize, determined by rates of growth and development of ears. *Field Crops Research* **27**: 281–298.
- Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, Hajirezeai M, Stitt M. 1992.** Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol. *Planta* **188**: 238–244.
- Jia L, Zhang B, Mao C, Li J, Wu Y, Wu P, Wu Z. 2008.** OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **228**: 51–9.
- Kapu NUS, Cosgrove DJ. 2010.** Changes in growth and cell wall extensibility of maize silks following pollination. *Journal of experimental botany* **61**: 4097–4107.
- Kiesselbach TA. 1949.** *The structure and reproduction of corn*. Lincoln, USA: University of Nebraska.
- Kohorn BD, Kobayashi M, Johansen S, Riese J, Huang L, Koch K, Fu S, Dotson A, Byers N. 2006.** An *Arabidopsis* cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *The Plant Journal* **46**: 307–16.
- LeClere S, Schmelz E, Chourey PS. 2010.** Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels. *Plant physiology* **153**: 306–318.
- Lilley JM, Fukai S. 1994.** Effect of timing and severity of water deficit on four diverse rice cultivars III. Phenological development, crop growth and grain yield. *Field Crops Research* **37**: 225–234.
- Lobell DB, Roberts MJ, Schlenker W, Braun N, Little BB, Rejesus RM, Hammer GL. 2014.** Greater Sensitivity to Drought Accompanies Maize Yield Increase in the U.S. Midwest. *Science* **344**: 516–519.
- Ma Y, Wang Y, Liu J, Lv F, Chen J, Zhou Z. 2014.** The effects of fruiting positions on cellulose synthesis and sucrose metabolism during cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber development. *PLoS one* **9**: 1–9.

- Mäkelä P, McLaughlin JE, Boyer JS. 2005.** Imaging and quantifying carbohydrate transport to the developing ovaries of maize. *Annals of botany* **96**: 939–949.
- McLaughlin JE, Boyer JS. 2004.** Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials. *Annals of botany* **94**: 675–689.
- Miller ME, Chourey PS. 1992.** The Maize Invertase-Deficient miniature-1 Seed Mutation Is Associated with Aberrant Pedicel and Endosperm Development. *The Plant cell* **4**: 297–305.
- Mól R, Filek M, Dumas C, Matthys-Rochon E. 2004.** Cytoplasmic calcium in silk trichomes after pollen grain reception and post-pollination changes of the electric potential in pistil tissues of maize. *Plant Science* **166**: 1461–1469.
- Morris D, Arthur E. 1984.** Invertase activity in sinks undergoing cell expansion. *Plant growth regulation* **2**: 327–337.
- Moss GI, Downey LA. 1971.** Influence of Drought Stress on Female Gametophyte Development in Corn (*Zea mays* L.) and Subsequent Grain Yield. *Crop Science* **11**: 368–372.
- Muller B, Pantin F, Genard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y. 2011.** Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1715–1729.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2007.** Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* **50**: 1093–1106.
- Otegui ME, Andrade FH, Suero EE. 1995.** Growth, water use, and kernel abortion of maize subjected to drought at silking. *Field Crops Research* **40**: 87–94.
- Pantin F, Fanciullino A-L, Massonnet C, Dauzat M, Simonneau T, Muller B. 2013.** Buffering growth variations against water deficits through timely carbon usage. *Frontiers in plant science* **4**: 483.
- Passioura JB. 2006.** The perils of pot experiments. *Functional Plant Biology* **33** : 1075–1079.
- Pioneer.com 2014.** *Corn Pollination Success – Drought Effects on Silk Growth*. [WWW document] URL <https://www.pioneer.com/home/site/mobile/grow/corn/pollination-success/> [accessed 11 April 2014].
- Poorter H, Bühler J, van Dusschoten D, Climent J, Postma JA. 2012.** Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Functional Plant Biology* **39** : 839–850.
- Qi X, Wu Z, Li J, Mo X, Wu S, Chu J, Wu P. 2007.** AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in Arabidopsis. *Plant molecular biology* **64**: 575–87.
- Qin L, Trouverie J, Chateau-Joubert S, Simond-Côte E, Thévenot C, Prioul J-L. 2004.** Involvement of the *Ivr2*-invertase in the perianth during maize kernel development under water stress. *Plant Science* **166**: 371–379.
- Rapport HF, Hammami SBM, Martins P, Pérez-Priego O, Orgaz F. 2012.** Influence of water deficits at different times during olive tree inflorescence and flower development. *Environmental and Experimental Botany* **77**: 227–233.
- Roitsch T, González M-C. 2004.** Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in plant science* **9**: 606–13.
- Ruan Y-L, Patrick JW, Bouzayen M, Osorio S, Fernie AR. 2012.** Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in plant science* **17**: 656–65.

- Sabelli P a, Larkins B a. 2009.** The development of endosperm in grasses. *Plant physiology* **149**: 14–26.
- Sadok W, Naudin P, Boussuge B, Muller B, Welcker C, Tardieu F. 2007.** Leaf growth rate per unit thermal time follows QTL-dependent daily patterns in hundreds of maize lines under naturally fluctuating conditions. *Plant, cell & environment* **30**: 135–146.
- Saini HS, Westgate ME. 2000.** Reproductive development in grain crops during drought. *Advances in Agronomy* **68**: 59–96.
- Sala RG, Westgate ME, Andrade FH. 2007.** Source/sink ratio and the relationship between maximum water content, maximum volume, and final dry weight of maize kernels. *Field Crops Research* **101**: 19–25.
- Schoper JB, Lambert RJ, Vasilas BL. 1986.** Maize Pollen Viability and Ear Receptivity Under Water and High Temperature Stress. *Crop Science* **26**: 1329–1333.
- Schoper JB, Lambert RJ, Vasilas BL, Westgate ME. 1987.** Plant Factors Controlling Seed Set in Maize. *Plant physiology* **83**:121–125.
- Schussler J, Westgate M. 1994.** Increasing assimilate reserves does not prevent kernel abortion at low water potential in maize. *Crop Science* **34**: 1569–1576.
- Schussler J, Westgate M. 1995.** Assimilate flux determines kernel set at low water potential in maize. *Crop Science* **35**: 1074–1080.
- Setter TL, Flannigan BA, Melkonian J. 2001.** Loss of Kernel Set Due to Water Deficit and Shade in Maize: Carbohydrate Supplies, Abscisic Acid, and Cytokinins. *Crop Science* **41**: 1530–1540.
- Shiferaw B, Prasanna BM, Hellin J, Bänziger M. 2011.** Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security* **3**: 307–327.
- Snell-Rood EC. 2012.** Selective processes in development: implications for the costs and benefits of phenotypic plasticity. *Integrative and comparative biology* **52**: 31–42.
- Sturm A. 1999.** Invertases . Primary Structures , Functions , and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant physiology* **121**: 1–7.
- Sturm A, Tang G. 1999.** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in plant science* **4**: 401–407.
- Sulpice R, Tschoep H, VON Korff M, Büssis D, Usadel B, Höhne M, Witucka-Wall H, Altmann T, Stitt M, Gibon Y. 2007.** Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant, cell & environment* **30**: 1163–1175.
- Tang GQ, Lüscher M, Sturm A. 1999.** Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant cell* **11**: 177–189.
- Tardieu F. 2012.** Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal of experimental botany* **63**: 25–31.
- Tardieu F, Granier C, Muller B. 2011.** Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current opinion in plant biology* **14**: 283–9.
- Tardieu F, Parent B, Caldeira CF, Welcker C. 2014.** Genetic and Physiological Controls of Growth under Water Deficit. *Plant Physiology* **164**: 1628–1635.
- Troll W, Lindsley J. 1955.** A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry* **215**: 655–660.

- Troyer AF. 2009.** Development of hybrid corn and the seed corn industry. In: Bennetzen JL, Hake SC, eds. *Handbook of maize*. New York, USA: Springer Science Business Media, 87-114.
- Uribelarrea M, Cárcova J, Borrás L, Otegui ME. 2008.** Enhanced kernel set promoted by synchronous pollination determines a tradeoff between kernel number and kernel weight in temperate maize hybrids. *Field Crops Research* **105**: 172–181.
- Uribelarrea M, Cárcova J, Otegui ME, Westgate ME. 2002.** Pollen Production, Pollination Dynamics, and Kernel Set in Maize. *Crop Science* **42**: 1910–1918.
- USDA 2013.** [WWW document] URL <https://www.fas.usda.gov/psdonline> [accessed 10 december 2013].
- Vega C, Andrade F, Sadras V. 2001.** Seed number as a function of growth. A comparative study in soybean, sunflower, and maize. *Crop Science* **41**: 748–754.
- Vigouroux Y, Glaubitz JC, Matsuoka Y, Goodman MM, Sánchez G J, Doebley J. 2008.** Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany* **95**: 1240–1253.
- Wang L, Li X, Lian H, Ni D, He Y-K. 2010.** Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and Arabidopsis root elongation through osmotic dependent and independent pathways,. *Plant Physiology* **154**: 744–756.
- Warburton ML, Wilkes G, Taba S, Charcosset A, Mir C, Dumas F, Madur D, Dreisigacker S, Bedoya C, Prasanna BM, et al. 2011.** Gene flow among different teosinte taxa and into the domesticated maize gene pool. *Genetic Resources and Crop Evolution* **58**: 1243–1261.
- Weatherwax P. 1916.** Morphology of the Flowers of *Zea mays*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **43**: 127–144.
- Weatherwax P. 1918.** The Evolution of Maize. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **45**: 309–342.
- Weatherwax P. 1923.** *The story of maize plant*. Chicago, USA : University of Chicago
- Welcker C, Boussuge B, Bencivenni C, Ribaut J-M, Tardieu F. 2007.** Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit? A QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. *Journal of experimental botany* **58**: 339–349.
- Welcker C, Sadok W, Dignat G, Renault M, Salvi S, Charcosset A, Tardieu F. 2011.** A common genetic determinism for sensitivities to soil water deficit and evaporative demand: meta-analysis of quantitative trait Loci and introgression lines of maize. *Plant physiology* **157**: 718–29.
- Westgate M, Boyer J. 1985.** Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* **164**: 540–549.
- Westgate M, Lizaso J, Batchelor W. 2003.** Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize. *Crop Science* **43**: 934–942.
- Wiens D, Calvin CL, Wilson CA, Davern CI, Frank D, Seavey SR. 1987.** Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* **71**: 501–509.
- Xiang L, Le Roy K, Bolouri-Moghaddam M-R, Vanhaecke M, Lammens W, Rolland F, Van den Ende W. 2011.** Exploring the neutral invertase-oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **62**: 3849–62.

- Xu J, Avigne WT, McCarty DR, Koch KE. 1996.** A Similar Dichotomy of Sugar Modulation and Developmental Expression Affects Both Paths of Sucrose Metabolism: Evidence from a Maize Invertase Gene Family. *The Plant cell* **8**: 1209–1220.
- Zinselmeier C, Jeong BR, Boyer JS. 1999.** Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant physiology* **121**: 25–36.
- Zinselmeier C, Lauer MJ, Boyer JS. 1995a.** Reversing Drought-Induced Losses in Grain Yield: Sucrose Maintains Embryo Growth in Maize. *Crop Science* **35**: 1390–1400.
- Zinselmeier C, Westgate ME, Jones RJ. 1995b.** Kernel Set at Low Water Potential Does Not Vary with Source/Sink Ratio in Maize. *Crop Science* **35**:158–163.
- Zinselmeier C, Westgate ME, Schussler JR, Jones RJ. 1995c.** Low Water Potential Disrupts Carbohydrate Metabolism in Maize (*Zea mays* L.) Ovaries. *Plant physiology* **107**: 385–391.

Déterminisme du nombre de grains chez le maïs (*Zea mays* L.) en déficit hydrique : rôles de la dynamique d'émergence des soies et du métabolisme carboné

Résumé : L'avortement des grains est l'une des premières causes de pertes de rendement chez le maïs en déficit hydrique. Il est le plus souvent attribué à un défaut d'approvisionnement carboné des ovaires. Nous avons testé le lien entre l'avortement et i) le développement des cohortes d'ovaires, ii) la cinétique d'émergence des soies, et iii) la disponibilité en carbone pour les ovaires, caractérisée par les quantités et concentrations en métabolites carbonés, ainsi que par les activités et abondances de transcrits d'enzymes clés à 3 stades de développement autour de la floraison. L'état carboné de la plante et des ovaires étaient favorables en déficit hydrique, rendant peu probable un avortement lié au métabolisme carboné. L'avortement a concerné les plus jeunes ovaires, situés en position apicale de l'épi. Il était consécutif à la perturbation de la croissance des soies qui a modifié leur cinétique d'émergence, réduisant ainsi le nombre de soies émergées. Le nombre final de grains était clairement lié au nombre de soies émergées lors de trois expériences concernant différentes intensités de déficit hydrique et 4 génotypes. Un mécanisme indépendant du carbone déclenche donc l'avortement dès l'émergence des soies, lors de la fertilisation des premiers ovaires. Il se produit avant l'avortement lié au manque de carbone classiquement décrit dans la littérature, et pourrait expliquer la majorité des pertes de rendements lors de périodes de sécheresse au champ. Ce travail ouvre des perspectives nouvelles pour la sélection et la modélisation du maïs en situation de manque d'eau.

Mots clés : Avortement, déficit hydrique, développement, ovaire, soies, grain, sucres solubles, invertases, maïs, croissance, reproduction

Determinism of grain number in maize (*Zea mays* L.) under water deficit: roles of silk emergence and of carbon metabolism

Abstract: Grain abortion is a major cause of yield loss in maize under water deficit. It is widely believed to be caused by photosynthate deprivation in ovaries. We have tested the link between abortion and (i) the development of ovary cohorts, (ii) the timing of maize silk emergence, and (iii) photosynthate availability, analysed via the amounts and concentrations of metabolites, together with the activities and transcript abundances of key enzymes at 3 dates around silk emergence. Plant and ovary carbon status were favourable under water deficit so a carbon-related abortion was unlikely. Abortion involved youngest ovaries, located at the ear apex. It resulted from a decreased silk growth that affected the dynamics of silk emergence, thereby limiting the number of emerged silks. Final grain number was accounted for by the number of emerged silks in three experiments with contrasting watering treatments and 4 genotypes. Hence, a switch to abortion occurred at silk emergence, when the first ovary fertilizations occurred, and before the period with classically described carbon-related abortion. The carbon-independent ovary abortion linked to the dynamics of silk emergence probably represents the major proportion of aborted grains in most drought scenarios in the field. This work opens new perspectives for breeding and for modelling the behaviour of maize in water deficit.

Key words: Abortion, water deficit, development, ovary, silk, grain, carbohydrates, invertase, maize, growth, reproduction