



**HAL**  
open science

# Colocalisation de gènes candidats positionnels avec des QTL de la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*

Komlan Avia

► **To cite this version:**

Komlan Avia. Colocalisation de gènes candidats positionnels avec des QTL de la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Technologie de Compiègne (UTC), FRA, 2008. Français. NNT: . tel-02947477

**HAL Id: tel-02947477**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02947477>**

Submitted on 24 Sep 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.



**Par AVIA Komlan**

**Colocalisation de gènes candidats positionnels  
avec des QTL de la tolérance au gel chez  
*Medicago truncatula***

**Thèse présentée  
Pour l'obtention du grade  
De Doctorat de l'UTC**



**Soutenue le : 13 octobre 2008**

**Spécialité : Biotechnologie et mise en œuvre des Fonctions Biologiques**

**D1620**

**Colocalisation de gènes candidats positionnels  
avec des QTL de la tolérance au gel chez  
*Medicago truncatula***

Soutenue le 13 octobre 2008 devant le jury composé de :

- M. J-L. HILBERT (Président)
- MME. I. LEJEUNE-HENAUT (Directeur de thèse)
- M. C. SALON (Rapporteur)
- M. T. HENDRIKS (Rapporteur)
- M. J-M. PROSPERI
- M. F. FRUGIER
- MME. B. THOMASSET





Ce travail de thèse a été possible grâce à un cofinancement provenant de l'Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes Riches en Protéines (UNIP) et de la région Picardie. Il a été mené au sein de l'UMR Stress Abiotiques et Différenciation des végétaux cultivés (SADV), sur le site d'Estrées-Mons.

## REMERCIEMENTS

---

Ce travail de thèse n'aurait sans doute pas été possible sans le cofinancement dont j'ai bénéficié. Par conséquent, je remercie en premier lieu les financeurs, que sont l'UNIP et la région Picardie.

Je remercie chaleureusement Isabelle Lejeune-Hénaut ma directrice de thèse pour m'avoir encadré pendant ces trois années que j'ai passées au sein de l'INRA d'Estrées-Mons. Au-delà de son encadrement scientifique, je n'oublie pas toute l'aide qu'elle m'a apportée au tout début de ma thèse pour mon installation dans la belle région de Picardie. Ses qualités humaines ne sont plus à démontrer. J'ai pu par ailleurs bénéficier de sa confiance et de son soutien pour les orientations que j'ai pu proposer dans le cadre de mes expérimentations et pour les congrès internationaux auxquels j'ai pu participer. Isabelle, le merci de mes lèvres sera peut être éphémère, mais celui de mon cœur sera sans fin.

Merci à Jean-Louis Hilbert et à Catherine Giauffret de m'avoir accueilli au sein de l'UMR SADV, dont ils sont le directeur et la directrice adjointe.

Je tiens particulièrement à remercier chacun des membres du jury, d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse, malgré leur emploi du temps chargé par ailleurs : Christophe Salon et Théo Hendriks qui sont les rapporteurs, ainsi que Jean-Louis Hilbert, Jean-Marie Prosperi, Brigitte Thomasset et Florian Frugier. Un merci spécial à Christophe Salon et Jean-Marie Prosperi qui ont par ailleurs participé activement à l'amélioration des orientations de la thèse à travers leurs contributions dans le cadre des différentes sessions de mon comité de pilotage.

Je remercie les autres membres du comité de pilotage qui sont : Marie-Christine Quillet, Christophe Vuylsteker, Bernadette Julier-Koubaiti et Béatrice Teulat Merah.

Je remercie les autres chercheurs et techniciens du site d'Estrées-Mons, qui m'ont apporté leur aide, d'une manière ou d'une autre, pendant cette thèse. Un merci particulier à Martine Niarquin qui m'a secondé tout au long de cette thèse pour la planification, la mise en place, le suivi, la récolte des données et certaines analyses de données des différentes expérimentations de la thèse. J'ai pu apprécier aussi ses qualités personnelles et sa grande gentillesse depuis le début de ma thèse jusqu'à la fin. A Martine Thomas, qui a toujours été là pour moi, même dans les circonstances les plus limites, je voudrais dire toute ma reconnaissance et mon respect pour ce qu'elle est. Martine, « ta petite crème brûlée » ne t'oubliera pas. A Christine aussi, je dis merci pour son aide quand j'en ai eu besoin. Merci à

Éric pour sa précieuse aide pour les traitements statistiques. A Frédo, un homme sympathique et toujours disponible, qui a cogité avec moi sur tous les aspects techniques de mes expérimentations et les a mis en œuvre, je veux témoigner toute ma reconnaissance. Je remercie Jean-François et Benoît pour leur sympathie et leur aide dans le cadre de mes expérimentations. Je n'oublierai pas les franches rigolades qu'on a eues. A toi Denis Florillo, je ne saurais te remercier assez pour toute ton aide pour les macros Excel dont j'ai eu besoin pour accélérer mes analyses ; surtout reste comme tu es. Merci à Odile et Anne-Sophie pour leur grande contribution dans le génotypage de marqueurs moléculaires.

A mes autres potes de baby-foot et au-delà, Aline, Kristelle, Hélène, Aurélien, Amandine, Stéphane, Didier, Jordan, Vincent, je n'ai plus besoin de vous dire à quel point je vous porte dans mon cœur, et que vous me manquerez une fois parti. Mais le monde est plus que jamais petit, alors on se reverra certainement. Merci à tous les autres stagiaires qui ont pu participer à la vie de cette station d'Estrées-Mons, à un moment où à un autre et que j'ai côtoyés.

Je remercie Gaétan et Karine pour leur aide précieuse tant pour des analyses de données que pour la relecture de mes écrits. A Véronique qui a partagé mon bureau pendant une bonne période de la thèse et qui a été d'une oreille attentive pour toutes mes questions, qui a su me donner des conseils pratiques quand il fallait et qui a relu mes papiers, je témoigne ma gratitude.

Je remercie chaleureusement Anca et Nasser pour leur grande contribution à l'analyse de mes données et à la rédaction de mes articles. Merci à tous les autres membres de l'équipe de Lille pour leur contribution à ce projet, d'une manière ou d'une autre.

Je remercie Martin Crespi et Florian Frugier qui ont participé pour une grande part à la réussite de ce projet de thèse.

Merci à Marie-Laure Pilet et Alain Baranger pour leur collaboration fructueuse et déterminante dans le cadre de ma thèse.

Merci à Magalie Delalande qui, sous la direction de Jean-Marie Prosperi, nous a gentiment envoyé les semences de *Medicago truncatula* à chaque fois qu'on en a eu besoin et a répondu à mes questions techniques à des périodes diverses au cours de la thèse.

Merci à Delphine Moreau pour l'aide qu'elle a pu m'apporter à travers ses propres travaux et son déplacement sur le site de Mons au début de ma thèse.

Sur un plan un peu plus personnel, je remercie mes parents, mes frères et ma sœur, qui m'ont soutenu tout le temps, surtout pendant les moments les plus difficiles. Quel réconfort que de savoir qu'on a une famille qui sera toujours là pour soi, quoi qu'il arrive!

Enfin, merci à toi Violaine, pour avoir toujours été là pour moi ; sans toi, ça ne se serait pas passé de la même façon. Tu sais déjà que je ne te remercierai jamais assez. Je te dédie cette thèse.

*A Violaine...*



## ABBREVIATIONS

---

<b>ABA</b>	Acide abscissique	<b>DRE</b>	Dehydration-Responsive Elements
<b>ABF</b>	ABRE binding factor	<b>DSC</b>	Differential scanning calorimetry
<b>ABRE</b>	ABA response element	<b>DTA</b>	Differential thermal analysis
<b>Acc</b>	Acclimation	<b>EIL</b>	Expansion-induced lysis
<b>AFLP</b>	Amplified fragment length polymorphism	<b>ElecLeak</b>	Electrolyte Leakage
<b>AFP</b>	Anti-freeze protein	<b>EMS</b>	Ethyl-méthyl-sulfonate
<b>AREB</b>	ABRE binding protein	<b>ERD</b>	Early Dehydration Induced
<b>BAC</b>	Bacterial artificial chromosome	<b>EREBP</b>	Ethylene-responsive element binding protein
<b>bZIP</b>	basic leucine zipper	<b>EST</b>	Expressed sequenced tag
<b>CAM</b>	Calmodulines	<b>EST</b>	Expressed sequence tag
<b>CAR</b>	Cold acclimation response	<b>EXP</b>	Experiment
<b>CAS</b>	Cold acclimation specific	<b>FDS</b>	Freezing damage score
<b>CBF</b>	C-repeat Binding Factor	<b>FDS2W</b>	Freezing damage score (after 2 weeks of warming)
<b>CBL</b>	Calcineurine B-like	<b>FJL</b>	Fracture-jump lesion
<b>CC</b>	Chlorophyll Content	<b>FLC</b>	Flowering Locus C
<b>CCI</b>	Chlorophyll Content Index	<b>FT</b>	Facteur de transcription
<b>CDPK</b>	Calcium dependent protein kinase	<b>HMG</b>	high mobility group
<b>CIM</b>	Composite interval mapping	<b>HR</b>	High response to photoperiod
<b>CIPK</b>	CBL-Interacting Protein Kinase	<b>ICE</b>	Inducer of CBF Expression
<b>COR</b>	Cold Regulated	<b>INA</b>	Ice nucleating agent
<b>CRT</b>	Calréticulines	<b>IRVT</b>	Infrared video thermography
<b>CRT</b>	C-Repeat Elements	<b>KIN</b>	Cold induced
<b>DGDG</b>	DiGalactosylDiacylGlycérol	<b>LA</b>	Leaf Area per plant
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	<b>LEA</b>	Late embryobeneses abundant

<b>LG</b>	Linkage group	<b>RAB</b>	Responsive to ABA
<b>LHC</b>	Light harvesting complex	<b>RAPD</b>	Random Amplification of Polymorphic DNA
<b>LOR</b>	Loss of osmotic responsiveness	<b>RD29A</b>	Responsive to Dehydration 29A
<b>LR3</b>	Lignées recombinantes N°3	<b>RDW</b>	Root dry weight per plant
<b>LRR</b>	Leucine rich repeat	<b>RFW</b>	Root fresh weight per plant
<b>LT50</b>	Lethal temperature 50%	<b>RGA</b>	Resistance gene analog
<b>LTI</b>	Low temperature induced	<b>RIL</b>	Recombinant inbred line
<b>LTRE</b>	Low-Temperature-Responsive Element	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase	<b>Rubisco</b>	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
<b>MGDG</b>	MonoGalactosylDiacylGlycérol	<b>RuBP</b>	Ribulose 1,5-bisphosphate
<b>MYB</b>	Myéloblastose	<b>RWCI</b>	Relative water content in leaves
<b>MYC</b>	Myélocytomatose	<b>RWCr</b>	Relative water content in roots
<b>N</b>	Nursery	<b>Rwm</b>	Rewarming
<b>NAC</b>	Non acclimated	<b>S</b>	Shoots
<b>NBS</b>	Nucleotide binding site	<b>SDW</b>	Shoot dry weight per plant
<b>NOL</b>	Number of leaves per plant	<b>SFW</b>	Shoot fresh weight per plant
<b>PAcc</b>	Pre-acclimation	<b>SOC</b>	Suppressor of overexpression of Constans
<b>PAR</b>	Photosynthetic active radiation	<b>SQDG</b>	SulfoQuinovosylDiacylGlycérol
<b>PEP</b>	Phosphoenolpyruvate	<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeat
<b>PG</b>	phosphatidylglycérol	<b>TC</b>	Tentative consensus
<b>PPCK</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	<b>TF</b>	Transcription factor
<b>PSII</b>	Photosystème II	<b>TILLING</b>	Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Loci	<b>VRN</b>	Vernalization
<b>R</b>	Roots	<b>WFD</b>	Winter frost damage



## SOMMAIRE

<b>PARTIE I. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>1</b>
I. LE CONTEXTE GENERAL .....	1
A. Le pois d'hiver, enjeux socio-économiques .....	1
B. Le contexte scientifique .....	4
II. LES OBJECTIFS DE LA THESE.....	6
<b>PARTIE II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>7</b>
I. <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> , UNE ESPECE MODELE POUR L'ETUDE DES LEGUMINEUSES	7
II. LES PLANTES FACE AUX BASSES TEMPERATURES .....	16
A. Les effets des basses températures .....	16
1. Les effets des basses températures au niveau agronomique .....	16
2. Les effets des basses températures au niveau de la plante .....	17
a. <i>Les dommages causés par le froid positif</i> .....	17
b. <i>Le gel et ses effets sur les plantes</i> .....	18
α. <i>Les différents types de gel</i> .....	18
β. <i>Les dommages causés par le gel</i> .....	18
3. Les effets des basses températures au niveau cellulaire.....	19
a. <i>La photoinhibition et les autres perturbations de la photosynthèse</i> .....	19
b. <i>La cristallisation de l'eau dans les cellules</i> .....	24
4. La nucléation de la glace .....	24
a. <i>Généralités</i> .....	24
b. <i>Les agents de nucléation de la glace</i> .....	25
c. <i>Les effets sur la membrane plasmique</i> .....	26
B. Les stratégies d'adaptation des plantes face au gel : évitement et tolérance ....	29
1. Les différentes stratégies d'évitement.....	29
a. <i>L'évitement cellulaire (freezing avoidance)</i> .....	29
b. <i>L'évitement développemental ou échappement (freezing escape)</i> .....	30
2. La tolérance au gel .....	32
a. <i>La tolérance au gel au niveau de la plante entière</i> .....	33
b. <i>Les aspects biophysiques de la tolérance au gel au niveau cellulaire</i> .....	34
C. L'acclimatation au froid : mécanismes et régulation.....	35
1. Les facteurs environnementaux déclenchant l'acclimatation au froid.....	35
2. Les principaux mécanismes physiologiques et biochimiques de l'acclimatation au froid .....	37
a. <i>La transduction du signal froid</i> .....	39
α. <i>La perception du signal</i> .....	39
β. <i>Le calcium comme second messenger</i> .....	42
b. <i>Les modifications subies par les membranes cellulaires sous l'effet des basses températures</i> .....	45
c. <i>L'acclimatation au froid et la photosynthèse</i> .....	46
3. La régulation des gènes de réponse au froid .....	51
a. <i>La voie de signalisation indépendante de l'ABA</i> .....	53
α. <i>Les découvertes chez Arabidopsis thaliana</i> .....	53
β. <i>Quelques travaux chez d'autres espèces végétales</i> .....	56
b. <i>La voie de signalisation dépendante de l'ABA</i> .....	56
c. <i>Le fonctionnement des gènes COR : exemple des déhydrines (DHN)</i> .....	58
<b>PARTIE III. CARTOGRAPHIE DE QTL DE TOLERANCE AU GEL CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....</b>	<b>60</b>

I. OBJECTIFS ET DEMARCHE.....	60
A. Mise au point d'un test d'évaluation de la tolérance au gel chez l'espèce <i>Medicago truncatula</i> .....	60
B. Mise en œuvre de la détection de QTL de tolérance au gel et de variables associées à la capacité d'acclimatation au froid sur la population LR3.....	64
II. RECHERCHE DE QTL DE DEGATS DE GEL ET DE PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES RELATIFS A L'ACCLIMATATION AU FROID CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....	64
TITLE.....	65
AUTHORS.....	65
ABSTRACT.....	66
INTRODUCTION.....	66
MATERIALS AND METHODS.....	68
Plant Material.....	68
Culture conditions.....	69
Visual freezing damage scoring.....	70
Electrolyte leakage assay.....	70
50% lethality temperature test (LT <sub>50</sub> , EXP1).....	71
Chlorophyll content (EXP2 and EXP3).....	72
Rubisco activity and total proteins determination (EXP2 and EXP3).....	72
Determination of the concentration of soluble sugars (EXP2).....	72
Genetic mapping and QTL analysis.....	73
Statistical analyses.....	74
RESULTS.....	76
LT <sub>50</sub> and freezing damage tests in 15 <i>M. truncatula</i> accessions.....	76
Characterization of the F83.005-5 and DZA.045-5 <i>M. truncatula</i> lines.....	78
Genetic linkage map and QTL mapping.....	81
DISCUSSION.....	90
Genetic variability for freezing tolerance in <i>M. truncatula</i> .....	90
Characterization of the parental lines subjected to different temperature regimes.....	92
Genetic linkage map and QTL for freezing tolerance in <i>M. truncatula</i> .....	93
Potential for the understanding of freezing tolerance in cultivated legumes.....	96
SUPPLEMENTAL MATERIAL.....	96
ACKNOWLEDGEMENTS.....	98
REFERENCES.....	99
<b>PARTIE IV. RECHERCHE DE GENES CANDIDATS IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE AU GEL CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i></b>	<b>104</b>
I. OBJECTIFS ET DEMARCHE.....	104
II. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE POUR LA RECHERCHE DE GENES REGULES PAR LE FROID ET LOCALISE DANS LES ZONES DE QTL DE TOLERANCE AU GEL.....	104
TITLE.....	105
AUTHORS.....	105
ABSTRACT.....	105
INTRODUCTION.....	106
MATERIALS AND METHODS.....	107
Plant material and environmental conditions.....	107
Genetic linkage map and QTLs mapping.....	108
RNA extraction and microarray hybridization.....	108

Experimental design .....	109
Data processing .....	109
Statistical analysis .....	109
In silico co-location of genes onto genetic map .....	110
<b>RESULTS .....</b>	<b>111</b>
Early and late acclimation response .....	111
Functional categorization of the differentially regulated genes during cold acclimation .....	112
QTL mapping .....	117
In silico co-location of genes into QTL intervals .....	119
Highest fold induced genes .....	131
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>133</b>
Early and late acclimation response .....	133
Cold perception and regulation mechanisms in <i>Medicago truncatula</i> cold tolerant plants .....	134
Cold-response of photorespiration .....	134
Cold-response of cryoprotective sugars .....	138
Cold-response of cryoprotective amino acids .....	138
Particular case of wound and disease resistance related genes .....	139
Selection of putative cold-induced candidate genes in QTL intervals .....	140
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>143</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>144</b>
<b>LITERATURE CITED .....</b>	<b>145</b>
<b>PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>152</b>
I. MISE AU POINT DES OUTILS DE PHENOTYPAGE DE LA TOLERANCE AU GEL CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....	152
A. Optimisation des tests de tolérance au gel en chambre climatisée .....	152
B. Mise en oeuvre du test de tolérance LT <sub>50</sub> réalisé en serre et chambre climatisée .....	153
II. VARIABILITE DE LA TOLERANCE AU GEL .....	154
III. CARTOGRAPHIE DE QTL .....	155
IV. VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES AU COURS DE L'ACCLIMATATION AU FROID .....	156
V. RECHERCHE DE GENES CANDIDATS LIES AUX QTL DE TOLERANCE AU GEL DETECTES .....	157
VI. VALIDATION DES GENES CANDIDATS .....	158
VII. TRANSFERT DE RESULTATS VERS LE POIS .....	159
<b>ANNEXES .....</b>	<b>160</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>170</b>

## Table des figures, tableaux et encadrés

<i>Figure I-1 : Débouchés du pois français</i>	4
<i>Figure II-1: Zones d'origine de <i>Medicago truncatula</i> et directions de son expansion sous l'effet des migrations.</i>	9
<i>Figure II-2 : Quelques illustrations de <i>Medicago truncatula</i>.</i>	10
<i>Figure II-3 : Relations phylogénétiques entre espèces de légumineuses.</i>	12
<i>Figure II-4 : Schématisation des différents processus de la photosynthèse en condition normale et sous stress froid.</i>	23
<i>Figure II-5 : Lésions causées par le gel à la membrane plasmique de protoplastes isolés.</i>	28
<i>Figure II-6 : Les différentes voies contrôlant la floraison chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.</i>	32
<i>Figure II-7 : Modifications adaptatives et protectrices induites par le froid pour l'acclimatation.</i>	37
<i>Figure II-8 : Représentation schématique des principales étapes de la réponse au froid</i>	38
<i>Figure II-9 : Voies de signalisation induites par le froid chez les végétaux.</i>	55
<i>Figure II-10 : Exemple d'interaction entre les voies dépendante et indépendantes de l'ABA : induction du gène RD29A d'<i>Arabidopsis thaliana</i>.</i>	57
<i>Figure III-1 : Photo illustrant le dispositif expérimental de l'évaluation de la tolérance au gel chez <i>Medicago truncatula</i>.</i>	62
<i>Figure III-2 : Photos illustrant la notation de dégât de gel sur quelques lignées de <i>Medicago truncatula</i>.</i>	62
<i>Figure III-3 : Photos de plantules des deux parents de la LR3 pendant une cinétique d'acclimatation.</i>	63
<i>Figure V-1 : Stratégie d'identification de genes candidats putatifs impliqués dans l'acclimatation au froid chez <i>Medicago truncatula</i></i>	157
<i>Tableau I-1 : Production, rendements et surfaces du pois dans l'Union Européenne</i>	3
<i>Tableau I-2 : Production, rendements et surfaces de protéagineux en France</i>	3
<i>Tableau II-1 : Données statistiques sur l'avancement du séquençage de <i>Medicago truncatula</i>.</i>	15
<i>Tableau II-2 : Récapitulatif des gènes impliqués dans la réponse au froid, classés en deux groupes (adapté de Agarwal et al., 2006)</i>	52
<i>Encadré 1 : Rappels sur la photosynthèse</i>	21
<i>Encadré 2 : Quelques rappels sur le cytosquelette et ses relations avec la membrane plasmique</i>	41
<i>Encadré 3 : Les décodeurs du signal calcique au cours de l'acclimatation au froid</i>	43
<i>Encadré 4 : Mesure <math>F_v/F_M</math> de la fluorescence chlorophyllienne</i>	48

## Figures et tableaux des articles

### Article 1: Diversity and QTL mapping for freezing tolerance in *Medicago truncatula*

Figure 1. Experimental conditions	70
Figure 2. $LT_{50}$ of 15 <i>M. truncatula</i> accessions	76
Table 1. Fifteen <i>M. truncatula</i> accessions lines analyzed for freezing tolerance with their agro-ecological descriptions and freezing damage scores after 2 weeks under rewarming conditions (FDS2W)	77
Figure 3. Rubisco initial and total activities and Rubisco activation in leaves of F 83005-5 and DZA 045-5	79
Figure 4. Chlorophyll content index (CCI) of F 83005-5 and DZA 045-5 parental lines	80
Figure 5a: Fructose, glucose and sucrose contents in shoots (S) and roots (R) of F 83005-5 and DZA 045-5 at 15 days of Nursery (N15), 8 days of pre-Acclimation (PAcc8) and 14 days of Acclimation (Acc14) phases using EXP2	81
Figure 5b. Cumulated fructose, glucose and sucrose contents in whole plants of both lines at the N15, PAcc8 and Acc14 stages	81
Table 2. Broad-sense heritabilities ( $h^2$ ) for traits mapped in the <i>M. truncatula</i> LR3 population with their standard errors	82
Figure 6. <i>M. truncatula</i> genetic map and QTL, established from a population of 178 F5-RILs derived from the cross between F 83005-5 and DZA 045-5	84
Table 3. QTL parameters in the <i>M. truncatula</i> LR3 population	86
Table 4. Correlation coefficients and associated P values calculated between each pair of the different traits analyzed in the <i>M. truncatula</i> LR3 population	88
Table 5. Correlation coefficients and associated P values calculated between ElecLeak evaluated after two weeks of rewarming on the one hand and FDS evaluated after 1 to 8 days of the freezing phase of EXP2 or after two weeks of rewarming on the other hand	88
Figure 7. Distribution of quantitative traits in <i>M. truncatula</i> LR3 population	89
Table S1. AFLP primer combinations employed to generate fingerprints	97
Table S2. Additional <i>Medicago truncatula</i> EST microsatellite primers used in this study	98

### Article 2: Correlating QTLs for freezing tolerance and related physiological traits to genes differentially expressed during cold-acclimation in the model legume *Medicago truncatula*

Figure 1. Venn diagram representing up-regulated and down-regulated genes found in early or late acclimation response in the <i>Medicago truncatula</i> tolerant genotype F 83005-5	112
---	-----



<i>Figure 2. Principal functional categories of the differentially expressed genes from transcriptomic analysis</i>	112
<i>Figure 3. Profile expression of acclimation regulated genes differentially expressed between F 83005-5 tolerant and DZA 045-5 sensitive plants</i>	113
<i>Table 1. QTLs parameters in M. truncatula population LR3</i>	118
<i>Figure 4. M. truncatula LR3 LG1 genetic map and freezing related QTLs</i>	120
<i>Table 2. Differentially expressed genes from transcriptomic analysis localizing in the 26 cM interval on LG1 of the UMN-map as shown in figure 4</i>	121
<i>Table 3. Statistics and functional repartition of potential cold-regulated candidate genes within freezing tolerance QTL intervals on M. truncatula LG1, LG4 and LG6</i>	123
<i>Table 4. LG1 highly expressed genes at the beginning and the end of the acclimation phase</i>	123
<i>Figure 5. M. truncatula LR3 LG4 genetic map and freezing related QTLs</i>	125
<i>Table 5. Differentially expressed genes from transcriptomic analysis localizing in the 17cM zone on LG4 of the UMN-map as shown in fig. 4</i>	126
<i>Table 6. LG4 highly expressed genes at EA &amp; LA. Only genes whose expression ratio at either stage was <math>\geq 3</math> fold were retained</i>	128
<i>Figure 6. M. truncatula LR3 LG6 genetic map and freezing related QTLs</i>	129
<i>Table 7. Differentially expressed genes from transcriptomic analysis localizing in the 7 cM interval on LG6 of the UMN-map as shown in fig. 4</i>	130
<i>Table 8. LG6 highly expressed genes at the end of the acclimation phase</i>	130
<i>Table 9. Highest fold (<math>\geq 10</math>) induced genes from the transcriptomic analysis either at EA or LA</i>	132
<i>Figure 7. Scheme representing photorespiration, as key of metabolic changes in Medicago truncatula F 83005-5 plants under cold stress</i>	137
<i>Table 10. Retained putative candidate genes for freezing tolerance in M. truncatula</i>	142

# **Partie I.**

## **Contexte et objectifs de la thèse**

<b>PARTIE I. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>1</b>
I. LE CONTEXTE GENERAL .....	1
A. Le pois d’hiver, enjeux socio-économiques .....	1
B. Le contexte scientifique.....	4
II. LES OBJECTIFS DE LA THESE.....	6

## Partie I. Contexte et objectifs de la thèse

---

Le travail de thèse présenté ici s'inscrit dans le cadre général des recherches pour l'amélioration de la tolérance au gel chez le pois (*Pisum sativum* L.), qui sont menées au sein de l'UMR « Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés » (SADV) sur le site INRA de Estrées-Mons dans la Somme, en région Picardie. Comme l'indique le titre du manuscrit, le travail de thèse en lui-même a été mené sur *Medicago truncatula* Gaertn. (noté par la suite *Medicago truncatula*) comme espèce modèle, mais il est important de le replacer dans son contexte général. C'est pourquoi, la partie I présente tout d'abord le contexte socio-économique de la culture du pois, puis les caractéristiques de l'espèce modèle *Medicago truncatula* pour justifier son utilisation dans le cadre des études génétiques menées sur les légumineuses d'intérêt agronomique comme le pois.

### I. Le contexte général

#### A. Le pois d'hiver, enjeux socio-économiques

La culture du pois protéagineux s'est développée en France au début des années 70, dans le contexte d'un effort européen pour produire des matières riches en protéines capables de se substituer au tourteau de soja dans l'alimentation animale. En effet, l'approvisionnement en protéine de l'Europe dépend depuis plus de 40 ans des importations depuis les Etats-Unis et l'Amérique du Sud. Dès 1962, avec la mise en place de la politique agricole commune (PAC), la Communauté Economique Européenne (CEE) fait le choix de favoriser la production céréalière au détriment de celle des oléo-protéagineux. En 1973, de mauvaises conditions climatiques font chuter la production de soja aux États-Unis, ce qui fait monter le prix de cette matière première. Pour protéger les intérêts de l'industrie du soja, les américains décrètent un embargo à l'exportation sur le soja. En guise de réponse, l'Europe met en place dès 1975 un plan protéines (soutien aux cultures de protéagineux et d'oléagineux, développement de nouvelles variétés utilisables dans l'alimentation animale<sup>1</sup>). Or, aujourd'hui encore 67% de la consommation européenne de tourteaux est constituée de soja qui est largement importé.

---

<sup>1</sup> [http://agritrade.cta.int/fr/content/view/full/2503#\\_ftnref3](http://agritrade.cta.int/fr/content/view/full/2503#_ftnref3)

La France est le premier producteur de pois en Europe avec environ 1 million de tonnes en 2006 (Tableau I-1). Cependant cette production baisse régulièrement depuis 1993 (Tableau I-2). Ce recul de la production s'explique notamment par le contexte économique plus favorable à la production de céréales (réforme de la PAC) et par des conditions climatiques et parasitaires préjudiciables à la productivité, notamment le développement du champignon du sol *Aphanomyces euteiches*. La production du pois représente plus de 50% de la production européenne de protéagineux et plus de 75% de la production française. L'amélioration variétale de cette culture s'est mise en place au fil du temps, relativement récemment par rapport à celle des grandes cultures céréalières. Sur le plan utilisation de la production, l'alimentation animale est le principal débouché du pois français (Figure I-1).

A cause de ses origines généalogiques (pois potager, pois de casserie) sensibles aux basses températures, le pois protéagineux est au départ une culture de printemps. Cependant, certains aspects négatifs sont liés au semis de printemps, notamment un cycle de développement court (environ 140 jours) qui limite la production de biomasse et donc le rendement, et des problèmes de stress hydriques et thermiques pendant l'élaboration du nombre de graines (coïncidence de la période de production du nombre de graines avec les fortes chaleurs de début d'été), ce qui se traduit par des rendements instables entre lieux et entre années. Pour améliorer la productivité et la stabilité des rendements, la sélection s'est orientée vers des variétés semées à l'automne pour allonger le cycle de développement tout en évitant les périodes de stress hydriques et thermiques en fin de cycle. S'ils ont un potentiel de rendement plus élevé, les pois d'hiver sont par contre confrontés à des facteurs limitants spécifiques de leur saison de culture, c'est-à-dire principalement le gel et certaines maladies fongiques comme l'antracnose qui sont favorisées par le froid et l'humidité. Les programmes de sélection publics et privés ont donc pris en compte ces différents objectifs.

Tableau I-1 : Production, rendements et surfaces du pois dans l'Union Européenne

- En année de récolte
- Surfaces : 1000 ha (semences comprises)
- Rendement : q/ha
- Production : 1000 tonnes
- Y compris Ex-RDA depuis 1990
- UE à 15 de 1995 à 2003 - UE à 25 depuis 2004

Provisoire pour 2005 et 2006

	1981	1987	1993	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
<b>ALLEMAGNE</b>												
Surfaces	1	52	59	169	165	141	164	148	136	122	110	93
Rendement	20	29	30,2	34,9	37,1	28,6	34,2	27,8	28,8	38,2	31,4	31,2
Production	2	151	178	589	610	403	560	413	392	464	346	289
<b>AUTRICHE</b>												
Surfaces	-	-	-	59	46	41	39	42	42	39	36	33
Rendement	-	-	-	30,4	30,3	23,5	29,2	23,1	22,1	31,0	25,0	27,5
Production	-	-	-	178	139	97	113	96	93	122	90	90
<b>DANEMARK</b>												
Surfaces	4	200	121	107	66	36	32	40	31	27	13	8
Rendement	30	26,3	37,5	36,7	29,2	38,3	35,3	37,0	39,8	36,0	33,4	23,6
Production	12	526	454	389	193	138	113	149	125	96	44	19
<b>FRANCE</b>												
Surfaces	69	422	737	623	489	424	416	331	363	354	311	236
Rendement	37,7	43	51	53,4	56,3	44,5	41,3	51,8	45,9	47,3	41,8	44,2
Production	260	1815	3758	3325	2750	1890	1720	1715	1670	1675	1300	1040
<b>ESPAGNE</b>												
Surfaces	5	5	10	56	43	43	49	79	105	136	147	155
Rendement	8	8	12,2	13	11,2	13,4	10,0	11,5	14,1	14,4	8,5	13,4
Production	4	4	12	73	48	57	49	91	148	195	124	207
<b>ROYAUME-UNI</b>												
Surfaces	24	120	81	102	90	86	102	85	70	62	53	46
Rendement	31,3	25	41	31,7	38,5	35,2	35,4	34,3	39,1	34,5	38,0	33
Production	75	300	332	323	346	303	361	292	273	215	201	152
<b>SUÈDE</b>												
Surfaces	-	-	-	48	30	26	27	27	24	27	24	22
Rendement	-	-	-	18	29	26	28	31	33	33	27	30
Production	-	-	-	85	86	67	76	84	79	88	65	66
<b>REP. TCHÈQUE</b>												
Surfaces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	29	27
Rendement	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	27	28
Production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72	79	76
<b>TOTAL UE</b>												
Surfaces	106	844	1029	1185	943	810	843	770	792	873	816	707
Rendement	34,2	34,9	46,8	42,4	44,7	37,0	36,1	37,6	36,0	36,1	29,9	30,2
Production	363	2940	4814	5022	4212	2995	3039	2892	2847	3156	2436	2136

Sources : UNIP avec Commission UE, Eurostat, sources professionnelles et nationales.

Tableau I-2 : Production, rendements et surfaces de protéagineux en France

- En année de récolte
- Production et collecte : en 1000 tonnes
- Surfaces : en 1000 ha
- Rendement : en quintaux/ha

Provisoire pour 2006

	1981	1993	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
<b>POIS</b>											
Surfaces dont semences certifiées	75	737	623	489	424	416	331	363	354	311	236
Rendement	38,3	51,1	53,4	56,3	44,5	41,3	51,8	45,9	47,3	41,8	44,2
Production	285	3776	3325	2750	1890	1720	1715	1670	1675	1300	1040
Collecte (1)	260	3360	3000	2400	1652	1346	1365	1385	1395	1150	930
<b>FEVEROLE</b>											
Surfaces dont semences certifiées	27	13	12,7	13,6	26,4	44	85	80,5	81	102	78
Rendement	30,3	44,8	38,2	45,0	41,5	38,0	44,8	36,2	46,0	38,9	41,7
Production	81	57	49	61	109	167	381	291	373	397	325
Collecte (1)	55	29	42	55	74	134	270	200	275	305	230
<b>LUPIN</b>											
Surfaces dont semences certifiées	0	3,5	4,2	5,6	10,9	13,6	15	12,5	9,5	7,4	7
Rendement	-	35	31	35	25	20	28	25	27	24	25
Production	0	12	13	20	27	27	42	31	26	18	18
Collecte (1)	0	6	3	5	9	6	5	5	3	3	3
<b>TOTAL PROTÉAGINEUX</b>											
Surfaces dont semences certifiées	101	754	640	508	461	474	431	456	445	420	321
Rendement	36	51	53,0	55,7	43,9	40,4	49,6	43,7	46,7	40,8	43,1
Production	366	3845	3387	2831	2026	1914	2138	1992	2074	1715	1383
Collecte	315	3395	3045	2460	1735	1486	1640	1590	1673	1458	1163

(1) non compris les semences et l'auto-consommation.

Sources : UNIP à partir des données ONIC/ONIOI/ONIGC, SCEES, SOC, GNIS et Recensement Général Agricole [surfaces 2000]

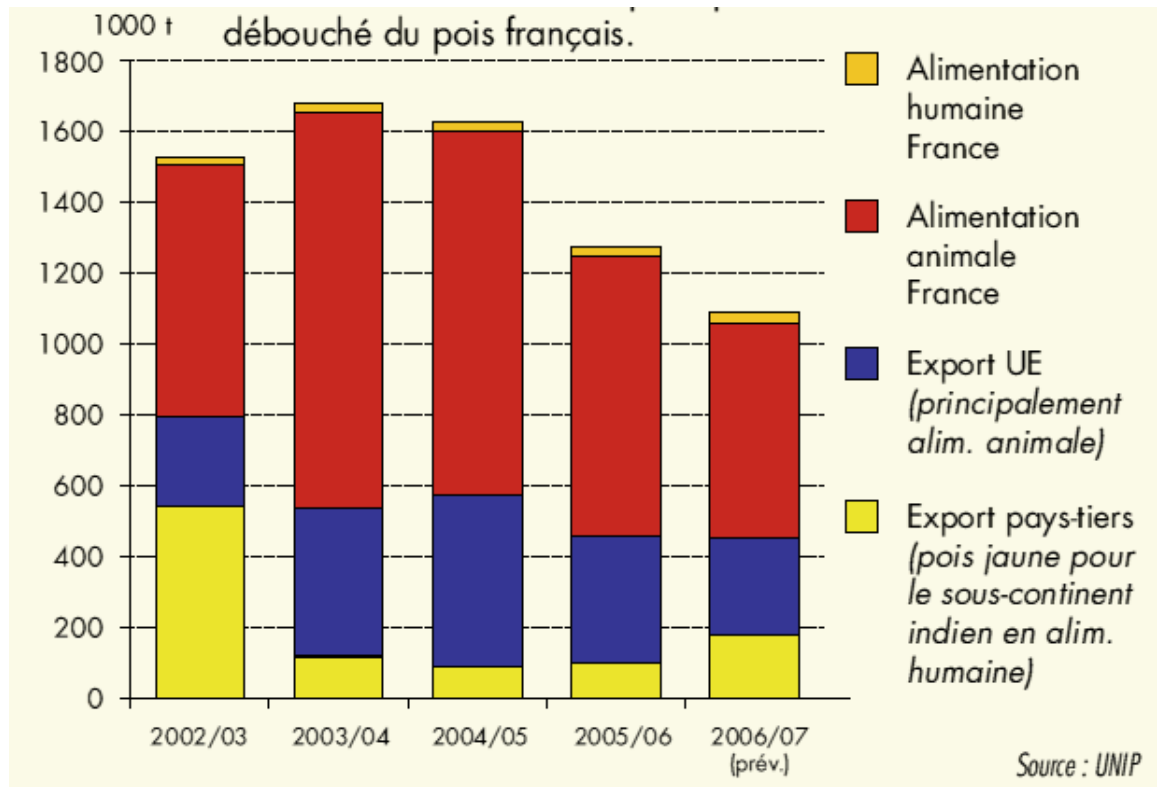


Figure I-1 : Débouchés du pois français

## B. Le contexte scientifique

Le contexte scientifique de ma thèse se rapporte à l'étude du déterminisme génétique de la tolérance au gel chez le pois en vue de créer des variétés de pois d'hiver améliorées pour la tolérance au gel. Un retour en arrière permet de se rendre compte que la plupart des programmes de sélection de pois d'hiver ont utilisé des variétés fourragères comme source de résistance (e.g. Champagne). En effet, les pois fourragers peuvent résister à des températures comprises entre  $-6$  et  $-14^{\circ}\text{C}$  (Murray et al., 1988). On sait maintenant que ces variétés fourragères possèdent une caractéristique d'échappement au gel, c'est-à-dire qu'elles sont capables de retarder leur initiation florale, stade à partir duquel la sensibilité au gel est plus forte, sous l'action des jours courts (Lejeune-Hénaut et al., 1999). Ainsi, ces pois fourragers, lorsqu'ils sont semés à l'automne, restent à l'état végétatif jusqu'au printemps suivant, ce qui leur permet d'échapper aux principales périodes hivernales de gel. Cette réaction très forte à la photopériode est contrôlée par le locus majeur *Hr* (Murfet, 1973). Des études comparatives de réponse à la photopériode chez des variétés de pois d'hiver montrent que cette caractéristique n'a pas été retenue dans les premiers programmes français de sélection de pois

protéagineux d'hiver (Lejeune-Hénaut et al., 1999), sans doute à cause d'une pression de sélection trop forte sur la précocité dès le début des programmes.

Dans son ensemble, le programme de recherche sur la tolérance au gel du pois propose une approche intégrée du déterminisme de cette tolérance au gel, en utilisant des informations relatives aux différents niveaux d'expression de ce caractère : (1) moléculaire (transcriptome, protéome), (2) physiologique et (3) comportement de la plante entière en milieu cultivé. La stratégie suivie par l'UMR SADV est assez classique et consiste d'une part à détecter des QTL (Quantitative Trait Loci) de tolérance et d'autre part à identifier des gènes candidats sous-jacents à ces QTL. Chez une espèce comme le pois, dont le génome est relativement grand (5000 Mpb) et non séquencé, l'étape d'identification de gènes candidats n'est pas simple. C'est pourquoi, comme pour d'autres plantes cultivées, on se tourne vers des plantes modèles à génome plus petit et séquencé. Deux espèces ont ainsi été plus particulièrement mises à contribution dans le cadre des recherches sur le pois, du fait de leur séquençage : *Arabidopsis thaliana* L. et *Medicago truncatula*.

La connaissance du déterminisme de la floraison chez *Arabidopsis thaliana* a déjà été utilisée pour séquencer des gènes majeurs de floraison chez le pois (Foucher et al., 2003). Dans le cadre de ces recherches, on a cependant pu noter que la connaissance de séquences orthologues entre *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* permettait d'accéder plus facilement aux séquences chez le pois grâce à la proximité phylogénétique de ces deux dernières espèces. Dans le contexte des recherches sur le froid et le gel, de très nombreux gènes ont déjà été étudiés chez *Arabidopsis thaliana* et il semblait peu judicieux de rechercher de façon exhaustive tous leurs correspondants chez le pois pour les cartographier. Par contre, la forte conservation de la macrostructure des génomes entre *Medicago truncatula* et *Pisum sativum* (Choi et al., 2004b; Zhu et al., 2005; Aubert et al., 2006) permet d'envisager une démarche parallèle entre les deux espèces en cartographiant des QTL de résistance au gel chez *Medicago truncatula* et en profitant du séquençage presque complet du génome pour définir des gènes candidats positionnels. Les gènes candidats positionnels sont des gènes localisés à proximité de marqueurs liés à un caractère contrôlé par un seul locus ou dans l'intervalle de confiance d'un QTL, et dont la fonction suggère qu'ils peuvent être la source de la variation génétique du caractère étudié. On ne peut bien sûr pas préjuger d'une correspondance complète du déterminisme génétique du caractère entre les deux espèces, mais un effort de cartographie comparative de QTL et de gènes devrait permettre de poser les bases d'une recherche efficace de gènes candidats positionnels pour le pois.



## II. Les objectifs de la thèse

Dans ce contexte de création de nouvelles variétés de pois plus productives et tolérantes au gel, mon travail de thèse avait pour objectif de fournir, chez *Medicago truncatula*, une première cartographie de QTL de tolérance au gel et de proposer une approche d'identification de gènes candidats positionnels.

Plusieurs éléments ont fortement influencé la mise en œuvre de ma recherche. Il s'agit tout d'abord de la détection de variabilité génétique pour la résistance au gel au sein de l'espèce *Medicago truncatula*. En étudiant les accessions qui constituent la collection française, l'équipe de Jean-Marie Prosperi (INRA Montpellier) a constaté des comportements différenciés pour la tolérance au gel en conditions naturelles et en particulier pour les lignées DZA 045-5 (sensible) et F83 005-5 (tolérant). Par ailleurs, la population de lignées recombinantes dérivée du croisement DZA 045-5 x F83 005-5 (population LR3) fait partie des populations construites par cette même équipe et ce matériel végétal est donc disponible pour des études génétiques. Enfin, la carte génétique de ce croisement a déjà été élaborée par l'équipe de Marie-Laure Pilet (INRA Rennes) pour l'étude de la résistance au pathogène *Aphanomyces euteiches* et elle a été mise à ma disposition. Muni de ces atouts liés aux collaborations entre les différentes équipes de l'INRA, les objectifs de ma thèse se sont alors déclinés en trois étapes : (1) mettre au point un test d'évaluation de la tolérance au gel chez l'espèce *Medicago truncatula*, (2) mettre en œuvre la détection de QTL de tolérance au gel et de variables associées à la capacité d'acclimatation au froid sur la population LR3 et (3) mettre en place une démarche d'identification de gènes candidats sous-jacents aux QTL détectés. La méthodologie de ces stratégies sera détaillée avec les résultats de ce travail de thèse, qui sont présentés sous forme de deux articles rédigés et en cours de correction pour soumission.

## **Partie II.**

# **Étude bibliographique**

## **PARTIE II. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 7**

I. <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> , UNE ESPECE MODELE POUR L'ETUDE DES LEGUMINEUSES	7
II. LES PLANTES FACE AUX BASSES TEMPERATURES	16
A. Les effets des basses températures	16
1. Les effets des basses températures au niveau agronomique	16
2. Les effets des basses températures au niveau de la plante	17
a. <i>Les dommages causés par le froid positif</i>	17
b. <i>Le gel et ses effets sur les plantes</i>	18
$\alpha$ <i>Les différents types de gel</i>	18
$\beta$ <i>Les dommages causés par le gel</i>	18
3. Les effets des basses températures au niveau cellulaire	19
a. <i>La photoinhibition et les autres perturbations de la photosynthèse</i>	19
b. <i>La cristallisation de l'eau dans les cellules</i>	24
4. La nucléation de la glace	24
a. <i>Généralités</i>	24
b. <i>Les agents de nucléation de la glace</i>	25
c. <i>Les effets sur la membrane plasmique</i>	26
B. Les stratégies d'adaptation des plantes face au gel : évitement et tolérance	29
1. Les différentes stratégies d'évitement	29
a. <i>L'évitement cellulaire (freezing avoidance)</i>	29
b. <i>L'évitement développemental ou échappement (freezing escape)</i>	30
2. La tolérance au gel	32
a. <i>La tolérance au gel au niveau de la plante entière</i>	33
b. <i>Les aspects biophysiques de la tolérance au gel au niveau cellulaire</i>	34
C. L'acclimatation au froid : mécanismes et régulation	35
1. Les facteurs environnementaux déclenchant l'acclimatation au froid	35
2. Les principaux mécanismes physiologiques et biochimiques de l'acclimatation au froid	37
a. <i>La transduction du signal froid</i>	39
$\alpha$ <i>La perception du signal</i>	39
$\beta$ <i>Le calcium comme second messenger</i>	42
b. <i>Les modifications subies par les membranes cellulaires sous l'effet des basses températures</i>	45
c. <i>L'acclimatation au froid et la photosynthèse</i>	46
3. La régulation des gènes de réponse au froid	51
a. <i>La voie de signalisation indépendante de l'ABA</i>	53
$\alpha$ <i>Les découvertes chez Arabidopsis thaliana</i>	53
$\beta$ <i>Quelques travaux chez d'autres espèces végétales</i>	56
b. <i>La voie de signalisation dépendante de l'ABA</i>	56
c. <i>Le fonctionnement des gènes COR : exemple des déhydrines (DHN)</i>	58

---

## Partie II. Étude bibliographique

---

Cette étude bibliographique est subdivisée en deux parties. La première présentera l'espèce *Medicago truncatula*, matériel d'étude de la thèse, ainsi que les différentes ressources qui ont fait d'elle l'espèce modèle des légumineuses. La deuxième partie se penchera sur les différents éléments physiologiques, biochimiques et moléculaires liés au stress basses températures et les réponses mises en œuvre par les plantes pour y répondre.

### I. *Medicago truncatula*, une espèce modèle pour l'étude des légumineuses

*Medicago truncatula* est une plante annuelle appartenant à la famille des Fabacées (*Fabaceae*). Cette famille (au sens strict de la classification classique) encore appelée famille des Papilionacées (*Papilionaceae*) est composée de plus de 13800 espèces réparties dans plus de 470 genres (Lewis et al., 2005). Au sens large (classification phylogénétique), elle est aussi appelée famille des légumineuses (*Leguminosae*) et comprend environ 700 genres et 20000 espèces réparties en trois sous-familles : celle des *Caesalpinioideae*, celle des *Mimosoideae* et celle des *Faboideae* ou *Papilionoideae* qui est la plus grande et la plus importante économiquement (Doyle and Luckow, 2003). Sur la base des études phylogénétiques moléculaires en utilisant par exemple la variabilité de séquence du gène *rbcL* codant pour la grande sous-unité de la Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (abréviation ultérieure Rubisco), les *Papilionoideae* et les *Mimosoideae* apparaissent comme étant monophylétiques (un groupe monophylétique est le regroupement constitué par un ancêtre commun et l'ensemble de ses descendants) alors que les *Caesalpinioideae* apparaissent paraphylétiques (composés d'espèces apparentées descendant d'un ancêtre commun, mais aussi d'espèces non apparentées ; Kajita et al., 2001; Wojciechowski et al., 2004). Les légumineuses constituent la troisième plus grande famille des angiospermes après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Mabberley, 1997). Elles sont très diverses ; ce sont des plantes herbacées, des arbustes, de grands arbres ou mêmes des lianes qu'on retrouve des zones froides aux zones tropicales (Rundel, 1989). La forme et la taille des fruits sont hautement variables.

Les légumineuses sont cultivées sur plus de 180 millions d'hectares, équivalents à 12 à 15% des terres arables et elles représentent environ 27% (en volume) des productions

agricoles mondiales (Graham and Vance, 2003). En termes de surfaces cultivées, elles constituent la seconde plus grande production après les céréales. Les légumineuses fournissent de nombreux métabolites secondaires exploités par l'industrie pharmaceutique notamment les isoflavonoïdes (qui possèdent des propriétés antioxydantes et qui sont exploités comme anti-allergiques ou anti-cancérogènes par exemple) et les triterpènes saponines (considérées comme stimulant l'immunité et ayant des propriétés de défense contre les pathogènes ; Choi et al., 2004b; Mun et al., 2006). Elles sont capables, comme la plupart des plantes, de s'associer à des champignons symbiotiques pour former des endomycorhizes (en échange de la fourniture de sucres aux champignons, la plante bénéficiant en retour de sels minéraux et d'eau). Mais surtout, grâce à une association symbiotique avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*, les légumineuses peuvent former des nodosités au sein desquelles les bactéries fixent l'azote atmosphérique sous une forme assimilable par la plante. Cette capacité de fixation symbiotique de l'azote leur confère une grande importance comme source de protéines à la fois dans l'alimentation humaine et animale, et comme source d'azote dans les écosystèmes naturels ou agronomiques ; la capacité de produire ainsi en abondance des protéines en l'absence de fertilisation étant d'un grand intérêt dans le cadre de l'agriculture durable. Paradoxalement, la nodulation à la base de la symbiose caractéristique de ces végétaux est absente chez beaucoup d'espèces de légumineuses (Doyle and Luckow, 2003). La nodulation n'est d'ailleurs pas confinée aux seules légumineuses, mais existe également chez 9 autres familles (Soltis et al., 1995). Les relations entre nodosités et tolérance au froid ne sont pas clairement établies ; cependant, chez *Medicago sativa* (luzerne cultivée, Duke and Doehlert, 1981; Tu and McDonnell, 1984) et chez *Phaseolus vulgaris* (haricot commun, Thomas and Sprent, 1983, 1984), il a été observé que dans des conditions d'acclimatation au froid, les plantes qui avaient une bonne nodulation présentaient une meilleure tolérance au gel déterminée par la survie hivernale.

*Medicago truncatula* est originaire du pourtour méditerranéen, mais l'espèce a été aussi introduite dans d'autres régions du monde, suivant les migrations européennes (Figure II-1) notamment en Australie où elle est cultivée depuis une centaine d'années, et où elle occupe encore maintenant une place prépondérante dans les systèmes prairiaux (Davidson and Davidson, 1993). C'est une plante autogame et diploïde ( $2n=16$ ) qui possède un génome de taille relativement petite (environ 500 Mpb/1C ; Blondon et al., 1994), entre trois et quatre fois supérieur à celui d'*Arabidopsis thaliana* mais environ dix fois inférieur à celui du pois.

Comme beaucoup de légumineuses, *Medicago truncatula* présente une croissance indéterminée, caractérisée par la présence sur chaque axe :

- d'un méristème apical à partir duquel les feuilles sont émises,
- de méristèmes axillaires végétatifs produisant des ramifications,
- de méristèmes axillaires reproducteurs à partir d'un certain nombre de nœuds et qui produisent les inflorescences (Benlloch et al., 2003; Moreau et al., 2006).

Les inflorescences portent entre 2 et 5 fleurs mesurant 5 à 8 mm. Ces fleurs contiennent au maximum une dizaine d'ovules et ne s'ouvrent qu'après une autopollinisation (cléistogamie). Cependant une allofécondation résiduelle est toujours possible après ouverture des fleurs. Les fleurs produisent des gousses spiralées avec des épines qui contiennent 6 à 10 petites graines (Figure II-2). Une longue période de vernalisation suivie d'une haute température combinée avec une longue photopériode permettent de réduire le délai d'apparition de la première fleur (Aitken, 1955; Clarkson and Russell, 1975; Heerden, 1984; Hochman, 1987).

L'expérience d'*Arabidopsis thaliana* comme espèce modèle a démontré l'intérêt des études sur un modèle pour accélérer les applications sur les espèces d'intérêt agronomique et a montré le succès de la mise en commun des ressources scientifiques au niveau mondial pour avancer plus rapidement. Cette approche a révolutionné les recherches sur les plantes. Cependant les distances phylogénétiques entre les différentes espèces botaniques peuvent être importantes et *Arabidopsis thaliana* ne peut pas servir de modèle à toutes les espèces.

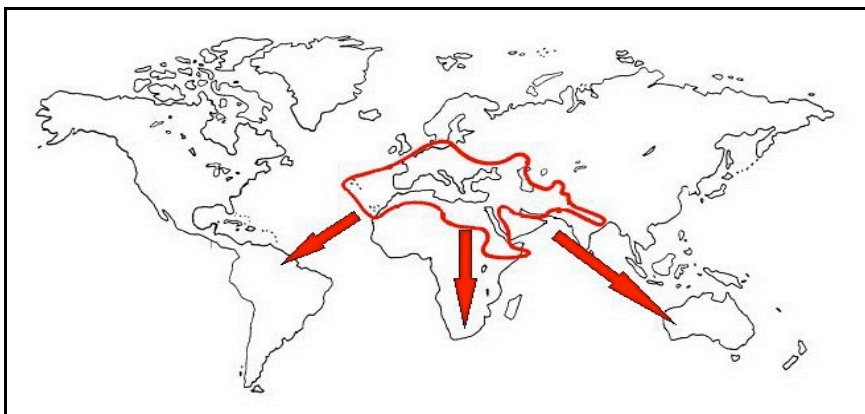


Figure II-1: Zones d'origine de *Medicago truncatula* et directions de son expansion sous l'effet des migrations.

(source : <http://www.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/mauguio/mauguio.php?page=menu12&numero=1>)

a)



b)



c)



*Figure II-2: Quelques illustrations de Medicago truncatula.*

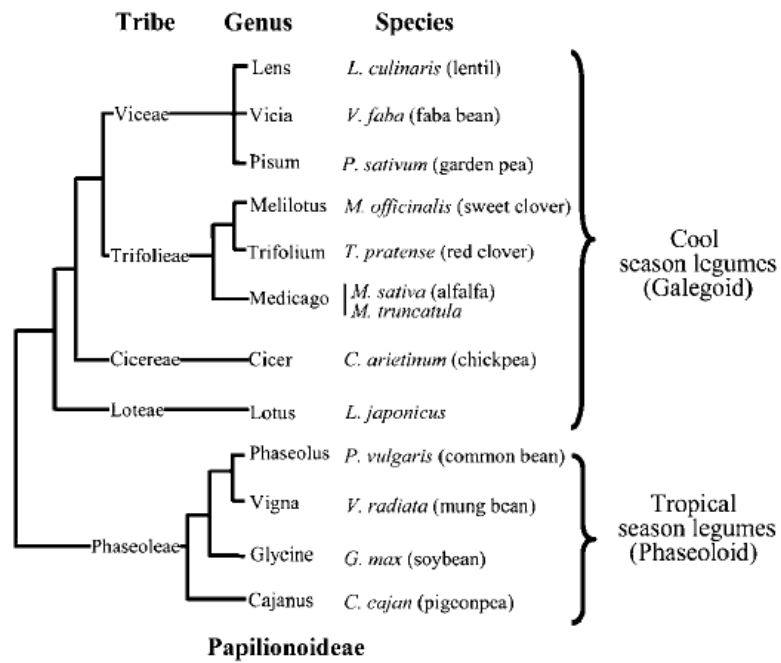
*Photos d'une plante (a), d'une inflorescence (b), de gousses et graines (c), et montrant la forme spiralée des gousses de Medicago truncatula. © Komlan Avia.*

D'ailleurs d'autres modèles ont été sélectionnés pour les principales familles d'importance agronomique, comme le riz (*Oryza sativa* L.) pour les céréales ou le peuplier (*Populus trichocarpa*) pour les arbres. En ce qui concerne les légumineuses, il se trouve qu'*Arabidopsis thaliana* est incapable de réaliser les deux types d'interactions symbiotiques (caractère important de la plupart des légumineuses) décrites précédemment et des études ont montré une importante divergence sur le plan de l'organisation du génome (Zhu et al., 2003). Pour ces raisons, l'attention des scientifiques a plutôt été portée sur deux espèces de légumineuse : *Medicago truncatula* (diploïde, 2n=16) qui est étudiée dans cette thèse et *Lotus japonicus* (diploïde, 2n=12). Les deux espèces sont séquencées et étudiées de façon indépendante (Jiang and Gresshoff, 1997; Cook, 1999; Frugoli and Harris, 2001). Bien que les deux espèces partagent de nombreuses propriétés notamment une petite taille de génome et une forte synténie (Choi et al., 2004b), le développement des deux modèles se justifie par deux principales divergences. *Medicago truncatula* est une espèce annuelle alors que *Lotus japonicus* est pérenne. Par ailleurs, chacune des deux espèces possède un type de développement nodulaire particulier : en effet, *Lotus japonicus* forme des nodules déterminés alors que dans le cas de *Medicago truncatula*, les nodules sont initiés à partir des divisions des cellules corticales internes et continuent de croître grâce à un méristème terminal persistant (VandenBosch and Stacey, 2003; Ané et al., 2008).

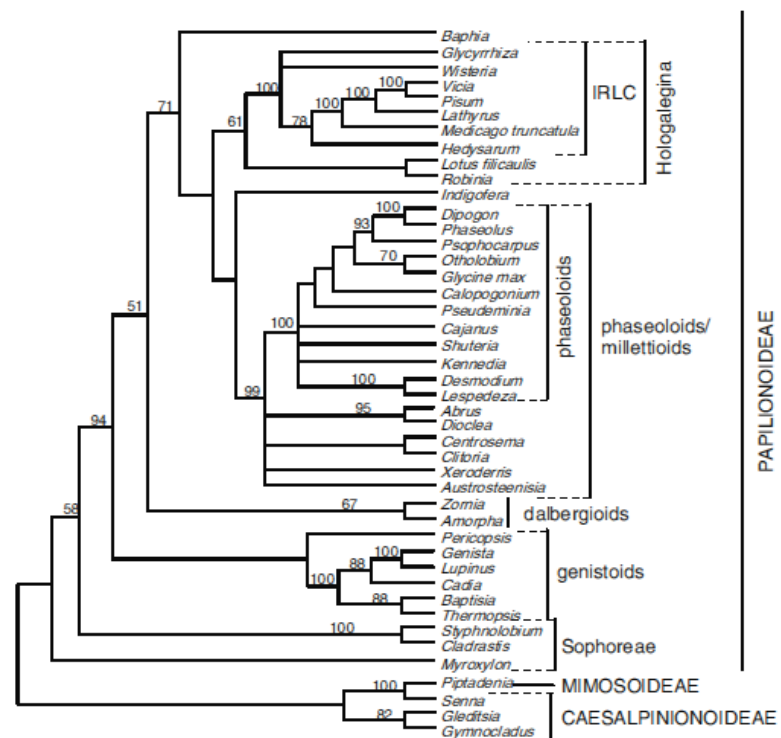
*Medicago truncatula* est proche phylogénétiquement de la plupart des légumineuses cultivées en Europe. Ces légumineuses de zones tempérées sont communément regroupées sous le clade des Galégoïdes et appartiennent à la sous-famille des *Papilionoideae*. *Medicago truncatula* présente ainsi une bonne synténie avec beaucoup de légumineuses d'intérêt agronomique (comme le pois, *Pisum sativum* ou la luzerne, *Medicago sativa*) et ce malgré une grande variété des systèmes génétiques, allant des diploïdes autogames aux polyploïdes allogames (Choi et al., 2004b). Notons que la synténie se décline en macrosynténie (correspondance de l'organisation des génomes c'est-à-dire celle du positionnement des gènes sur les chromosomes de façon générale) et en microsyténie (similitude de séquences gène à gène). La Figure II-3a (Zhu et al., 2005) montre une classification simplifiée des espèces au sein de la sous-famille des *Papilionoideae*. Elle est basée sur l'étude de la variabilité de séquence du gène chloroplastique de maturase *matK* (région codante d'environ 1500 pb). C'est un gène très répandu chez les végétaux, qui présente un grand polymorphisme et qui est de plus en plus utilisé dans les constructions phylogénétiques car il donne une meilleure résolution que d'autres gènes chloroplastiques comme le gène *rbcL* largement utilisé jusqu'à présent en systématique des plantes (Johnson et al., 1996; Hilu and Liang, 1997). Cette



classification basée sur *matK* est confirmée par l'utilisation de marqueurs moléculaires dérivés de gènes nucléaires (Figure II 3b, Choi et al., 2006).



a)



b)

Figure II-3 : Relations phylogénétiques entre espèces de légumineuses.

- Basées sur le gène chloroplastique de la maturase K (*mat K*, Zhu et al., 2005).
- Basées sur les séquences concaténées de 8 gènes nucléaires : Carboxyl-terminal peptidase, Cytchrome B, Cystéine protéinase like, Facteur d'élongation G, Précurseur de la Rubisco activase, UDP-glucose 6-déshydrogénase, tRNA-Ala synthase cytosolique et Calréticuline (Choi et al., 2006).

La forte synténie entre *Medicago truncatula* et d'autres légumineuses d'intérêt agronomique est un avantage pour la recherche de gènes orthologues et pour envisager un clonage positionnel. Cette espèce peut donc représenter un dénominateur commun pour ces espèces du point de vue des études agronomiques. Grâce aux collaborations entre diverses équipes de recherche à travers le monde, les études sur *Medicago truncatula* se sont accumulées et permettent de comprendre ses mécanismes physiologiques et biochimiques et d'établir les bases de son déterminisme génétique. Ces études exploitent les nombreux avantages que présente l'espèce tels que :

- un cycle de reproduction relativement court sous serre (10 à 12 semaines de graine à graine après vernalisation) ;
- aptitude à réaliser la symbiose avec la bactérie *Sinorhizobium meliloti* dont le génome a été séquencé<sup>1</sup>, permettant ainsi de disposer d'un système modèle pour les études d'interaction plante-bactérie (Barker et al., 1990) ;
- facilité de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ; la régénération est possible par embryogénèse somatique (Thomas et al., 1992; Chabaud et al., 1996; Trieu and Harrison, 1996; Trinh et al., 1998; Zhou et al., 2004) ;
- nombreuses ressources génétiques naturelles disponibles (Prosperi, 2000) ainsi que de nouvelles ressources obtenues par mutations induites notamment par l'éthyl-méthyl-sulfonate (EMS, Penmetsa and Cook, 2000), par insertion de rétrotransposons ou d'ADN-T (Scholte et al., 2002; Tadege et al., 2005; Tadege et al., 2008), ou même par l'utilisation de rayons  $\gamma$  (Sagan et al., 1995) ;
- optimisation de systèmes de génétique directe et inverse tels que la mutagenèse insertionnelle (d'Erfurth et al., 2003), l'ARN interférence (Limpens et al., 2004) et le TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, McCallum et al., 2000) ;
- caractérisation du génome de la plante par des études transcriptomiques (Fedorova et al., 2002; Journet et al., 2002; Lamblin et al., 2003), protéomiques (Gallardo et al., 2003; Watson et al., 2003; Imin et al., 2004) et métabolomiques (Huhman and Sumner, 2002; Broeckling et al., 2005; Barsch et al., 2006; Farag et al., 2007) ;
- étude des bases moléculaires des interactions symbiotiques (Penmetsa and Cook, 1997; Harrison et al., 2002; Limpens et al., 2003; Mathesius et al., 2003) ;

---

<sup>1</sup> <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/rhime>

- création de cartes génétiques denses en marqueurs (Thoquet et al., 2002; Choi et al., 2004a) ainsi que d'une carte consensus génétique-physique<sup>1</sup> (Annexe 1).

Le séquençage du génome de *Medicago truncatula* est un projet international de grande ampleur. En 2003, l'US National Science Foundation, en collaboration avec le 6<sup>e</sup> programme cadre de l'UE, initie ce projet de séquençage complet. Kulikova et al. (2001) avaient montré que les régions géniques euchromatiques des bras chromosomiques étaient potentiellement celles qui regroupaient la plupart des gènes transcrits alors que les zones centromériques et péri-centromériques étaient riches en hétérochromatine et pauvres en gènes transcrits. Le séquençage s'est alors concentré sur ces zones euchromatiques. Pour ce faire, la technique BAC à BAC (séquençage des clones de BAC de façon à obtenir des assemblages contigus ou quasi-contigus de tout le génome en se basant sur les extrémités des différents BAC produits, Young et al., 2005) a été adoptée. Ce projet est coordonné par un comité international qui s'est formé pour renforcer et accélérer un premier projet qui avait commencé plus tôt en 2001 à l'Université d'Oklahoma avec la Samuel Roberts Noble Foundation. Quatre centres se sont partagés ce travail :

- Aux Etats-Unis, l'Université d'Oklahoma (University of Oklahoma Advanced Center for Genome Technology) s'est chargée des chromosomes 1, 4, 6 et 8, alors que l'Institut de Recherches Génomiques (TIGR) séquence les chromosomes 2 et 7 ;
- Au Royaume Uni, le Sanger Institute s'est occupé du chromosome 3 avec l'aide du John Innes Center ;
- En France, le Genoscope a pris en charge le chromosome 5 avec l'aide de l'INRA.

A la date de Juillet 2008, les nombreux outils de génomique mis à contribution ont permis de produire chez *Medicago truncatula* 249625 EST (Expressed Sequence Tags), provenant de conditions physiologiques variées<sup>2</sup>, ce qui place l'espèce au 15<sup>e</sup> rang chez les végétaux et au 2<sup>e</sup> rang chez les légumineuses, après le soja. Pour ce qui est du séquençage<sup>3</sup>, l'objectif de départ était de séquencer environ 300 Mpb en se concentrant sur les zones riches en gènes, ce qui devait permettre la cartographie physique d'environ 95% des EST produits. A ce jour, la totalité des portions séquencées cartographie environ 60% des EST disponibles

---

<sup>1</sup> <http://www.medicago.org/genome/map.php>

<sup>2</sup> [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)

<sup>3</sup> <http://www.medicago.org/genome/>

sur la carte physique. Le travail continue donc pour aboutir à l'objectif des 300 Mpb dont on ne sait pas si elles correspondront réellement à 95% des gènes exprimés. Le Tableau II-1 regroupe quelques chiffres sur l'état d'avancement du séquençage.

Tableau II-1 : Données statistiques sur l'avancement du séquençage de *Medicago truncatula*.  
Source : [http://www.medicago.org/genome/genome\\_stats.php](http://www.medicago.org/genome/genome_stats.php)

Table 1: BAC clones in Mt2.0 assembly

chromosome	Chr1	Chr2	Chr3	Chr4	Chr5	Chr6	Chr7	Chr8	unanchored	Total
phase 1	73	16	21	94	8	39	19	58	39	367
phase 2	24	36	11	33	44	26	42	35	11	262
phase 3	129	175	274	172	266	70	199	169	28	1482
OU	212	83	95	286	74	132	111	254	71	1318
TIGR	13	140	0	13	9	3	142	5	2	327
GENOSCOPE	1	0	0	0	234	0	0	0	2	237
SANGER	0	1	211	0	0	0	5	1	3	221
OTHER	0	3	0	0	1	0	2	2	0	8
Total BACs	226	227	306	299	318	135	260	262	78	2111

Table 2: Assembly of the *M. truncatula* genome sequence

chromosome	Chr1	Chr2	Chr3	Chr4	Chr5	Chr6	Chr7	Chr8	unanchored	Total
BACs	226	227	306	299	318	135	260	262	78	2111
Singletons	6	2	7	6	2	3	10	6	72	114
Contigs	44	37	55	52	27	34	39	56	2	346
Scaffolds	39	33	44	39	14	29	33	48	3	282
Gaps (between scaffold)	44	34	50	44	15	31	44	53	75	390
Sequence (bp)	23975187	22539060	29247656	31006788	34139045	14478879	25393341	26415466	7538850	214734272
Pseudomolecule(bp) no 100,000 Ns	26870187	24469060	33177656	34961788	35789045	16893879	28128341	29950466	9448850	239689272
Pseudomolecule(bp) with 100,000 Ns	31270187	27869060	38177656	39361788	37289045	19993879	32528341	35250466	16948850	278689272
Scaffold avg (bp)	667,502	735,535	771,648	891,193	2,739,187	561,892	807,498	600,564	353,091	795,199
Scaffold N-50 (bp)	543,021	520,800	633,189	643,598	2,225,571	423,029	632367	453,829	321,201	710,733

## **II. Les plantes face aux basses températures**

Les plantes présentent une grande variation dans leur capacité à survivre aux basses températures. En fonction de cette sensibilité aux basses températures, on peut les classer en trois principales catégories :

- Les plantes tropicales et subtropicales sont en général sensibles aux basses températures non gélives (inférieures à 10 ou 15°C) ; les dommages sont causés par une dégradation totale des processus métaboliques et cellulaires et une altération des propriétés membranaires. On distingue deux types de sensibilité dans ce groupe : (1) les espèces complètement sensibles, c'est-à-dire, dont toutes les parties de la plante sont sensibles au froid et (2) les espèces partiellement sensibles où certains organes (primordia floraux, fruits mûrissants) et certains stades du cycle de la plante (imbibition des graines, germination et émergence) peuvent être plus sensibles que d'autres ; chez le riz par exemple, l'exposition des primordia floraux au stade tétrade à des températures inférieures à 10°C entraîne une stérilité des pollens. Plusieurs plantes d'intérêt agronomique sont sensibles au froid positif, c'est le cas du cotonnier, du soja, du maïs, ou de la tomate (Lyons, 1973).
- Les plantes résistantes au froid mais sensibles au gel sont capables de survivre à des températures basses et parfois légèrement en dessous de zéro, mais sont sévèrement endommagées par la formation de glace dans les tissus. C'est le cas de la pomme de terre.
- Les plantes tolérantes au gel peuvent survivre à un large éventail de températures gélives, la température seuil de tolérance dépendant de l'espèce concernée, du stade de développement et aussi de la durée du stress. C'est le cas de certaines céréales comme le seigle, le blé ou l'orge ou encore de certains arbres forestiers des régions tempérées.

### **A. Les effets des basses températures**

#### **1. Les effets des basses températures au niveau agronomique**

Les basses températures constituent un des facteurs les plus importants qui limitent la croissance, le développement et la répartition des plantes dans le monde (Parker, 1963; Boyer, 1982; Sakai and Larcher, 1987). Elles perturbent l'activité métabolique, inhibent le fonctionnement optimal des processus physiologiques et peuvent entraîner la mort des plantes

en causant des dommages irréversibles. Les pertes de productivité peuvent avoir des répercussions économiques très importantes pour les agriculteurs. Aux États-Unis par exemple, les pertes économiques dues au gel surpassent celles de tous les autres phénomènes abiotiques (White and Haas, 1975). Outre les pertes directes de rendement, le froid peut également affecter de manière importante la qualité des productions (Graham and Patterson, 1982). Les dommages engendrés par les basses températures dépendent à la fois de la température atteinte et de la durée d'exposition.

## **2. Les effets des basses températures au niveau de la plante**

Les symptômes potentiels des dommages dus aux basses températures et qui sont visibles rapidement impliquent des lésions surfaciques et une apparence trempée des tissus. Une production accrue de l'éthylène entraîne une accélération de la sénescence et la plante subit un raccourcissement de son cycle de vie. On peut également observer un pourrissement rapide des organes qui est lié à la fuite des métabolites (Pragya et al., 2005).

### **a. Les dommages causés par le froid positif**

Les dommages causés par le froid positif sont essentiellement dus aux perturbations subies par la physiologie de la plante. Les symptômes les plus communs de ces dommages impliquent un flétrissement des feuilles, une décoloration due à la photo-oxydation des pigments, un brunissement et des nécroses foliaires pouvant aboutir à l'inhibition de la croissance et la mort de la plante. Sur les fruits, le froid peut provoquer des zones de nécrose, un ramollissement des tissus et un brunissement rapide de la peau (Basra and Basra, 1997). L'âge physiologique de la plante au moment du stress joue un rôle important dans l'étendue des éventuels dégâts. Les graines en germination et les très jeunes plantules seront donc plus sensibles que les plantes plus âgées (Bedi and Basra, 1993). L'étape de la floraison est aussi très sensible, alors que les graines sèches sont résistantes. Dans le cas de certains fruits comme la banane, l'orange ou le raisin, on peut observer une évolution anormale de l'éthylène qui les empêche de mûrir (Singh, 2003). Par ailleurs, chez la plupart des espèces tropicales, le froid entraîne une baisse drastique de la perméabilité à l'eau des racines.

## **b. Le gel et ses effets sur les plantes**

### **α. Les différents types de gel**

Il existe deux types de gel : le **gel advectif** et le **gel radiatif** (Kalma et al., 1992). Le gel advectif intervient lors du passage d'un front froid sur une région (système dépressionnaire). Il est associé à des conditions nuageuses avec des vents modérés ou forts, sans inversion de la température (situation où une couche d'air chaud qui est normalement plus près du sol se retrouve au dessus d'une masse d'air froid bloqué près du sol, qui ne peut donc s'élever et se disperser dans l'atmosphère) et la température peut passer en dessous de 0°C durant la journée. Le gel radiatif est plus couramment observé. Il est caractérisé par un refroidissement dû à une perte de chaleur par ciel clair, dans des conditions calmes ou avec très peu de vent, et est associé avec une inversion de température. Pendant le gel radiatif, les températures descendent en dessous de 0°C la nuit mais sont supérieures à 0°C durant le jour. S'il est plus difficile de lutter contre le gel advectif, plusieurs méthodes de lutte existent en ce qui concerne le gel radiatif. On peut par exemple limiter la perte de chaleur du sol sous forme de rayonnement thermique afin de limiter l'inversion de température, homogénéiser les températures en mélangeant la couche d'air chaud en altitude et la couche d'air froid au sol ou injecter une nouvelle source de chaleur pour augmenter les températures au sol (Snyder and de Melo-Abreu, 2005).

### **β. Les dommages causés par le gel**

Contrairement au stress froid positif qui est surtout fréquemment observé chez les plantes tropicales et subtropicales, le stress gel peut survenir chez tous les types de plante. Le stress gel est le plus répandu et le plus largement étudié. Outre les perturbations physiologiques, une grande partie des dommages est due aux lésions mécaniques entraînées par la formation de la glace dans les tissus.

Chez les arbres, lorsque les hivers sont rigoureux, l'écorce et les autres tissus ligneux ainsi que les bourgeons peuvent geler. On peut ainsi distinguer des nécroses au niveau des angles des ramifications et une fragmentation des écorces. Le tronc entier ainsi que le collet peuvent également se fendre si le gel devient trop intense. Lorsque le tronc gèle, les cellules du xylème meurent, le bois s'oxyde pour devenir sombre et décoloré et les vaisseaux se

remplissent d'occlusions gélatineuses. Ces dommages constituent souvent des entrées aux parasites et autres microbes qui peuvent précipiter la mort de la plante ou réduire considérablement sa durée de vie (Burke et al., 1976).

Lorsque la température descend en dessous d'un certain seuil dépendant du type de plante, le rôle protecteur joué par le sol se trouve limité et les racines peuvent être nécrosées en gelant ; ceci est particulièrement important chez les espèces herbacées dont les racines sont enfouies moins profondément dans le sol que celles des grands arbres (Myers, 1988). Par ailleurs, chez les herbacées comme le pois, à la suite d'un stress gel, on peut observer d'abord des brûlures sur le bord des limbes, puis une progression des nécroses vers le reste de la plante via la tige pour enfin toucher la plante entière et causer sa mort. Chez le pois cette progression se fait de façon descendante, les étages terminaux étant touchés en premier (Lejeune-Henaut et al., 2005).

### **3. Les effets des basses températures au niveau cellulaire**

Les symptômes des dégâts dus aux basses températures, visibles au niveau d'une plante entière ou d'un peuplement, sont la traduction des effets très variés de ces températures au niveau cellulaire. Cette partie sera donc proportionnellement plus développée pour pouvoir présenter les différents effets des basses températures sur les cellules végétales.

#### **a. La photoinhibition et les autres perturbations de la photosynthèse**

A basse température, les réactions enzymatiques de la fixation du carbone (phase photochimique de la photosynthèse, cf. Encadré 1) sont retardées. Ce retard engendre à son tour un décalage entre l'énergie chimique cumulée grâce aux réactions de collecte de la lumière d'une part et la capacité d'absorption des puits métaboliques d'autre part. Lorsque l'énergie lumineuse absorbée par la plante excède la capacité de cette dernière à utiliser cette énergie au travers des réactions photosynthétiques (quenching photochimique) ou à la dissiper sous forme radiative par la fluorescence ou la chaleur (quenching non photochimique), le PSII peut être endommagé (cf. Figure II-4b et c) : c'est la **photoinhibition** (Osmond, 1994; Huner et al., 1998). La photoinhibition provoque via des réactions photo-oxydatives, la formation d'espèces réactives d'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS ; Foyer et al., 1994; Asada, 1996; Wanner and Junntila, 1999; Kanervo et al., 2005; Ensminger et al., 2006). Les ROS regroupent des radicaux libres d'oxygène et des non-radicaux qui sont des agents oxydants ou



facilement convertis en radicaux ; les plus connus sont  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$  et  $H_2O_2$  (Halliwell, 2006). L'accumulation de ces ROS dans les plantes (et autres organismes aérobies) peut entraîner des dommages sévères (Zelko et al., 2002; Halliwell and Whiteman, 2004; Seong et al., 2007). En effet, les ROS s'attaquent aux pigments photosynthétiques, aux membranes des thylakoïdes (principalement les lipides et acides gras) et aux protéines et sont responsables de la perte d'activité du PSII, causée par la dégradation de la protéine D1 (Encadré 1 ; Aro et al., 1993; Krieger-Liszkay, 2005). En fonction de l'intensité du froid ou du temps d'exposition, ces dommages peuvent devenir irréversibles.

Dans un premier temps, si la photoinhibition n'est plus contrôlée, elle provoque une diminution significative de la productivité de la plante, car l'assimilation de l'eau et des nutriments se trouve perturbée. Dans un second temps, si la baisse de température s'accroît, la photoinhibition affecte l'intégrité même des membranes cellulaires et des thylakoïdes et peut à terme compromettre tous les processus métaboliques de la plante et provoquer sa mort (Beck et al., 2007).

Par ailleurs, les basses températures affaiblissent les liaisons hydrophobes déterminantes pour la structure tertiaire des protéines et ceci peut entraîner une modification dans la cinétique ou la spécificité vis-à-vis du substrat de certaines enzymes clés du métabolisme cellulaire (Brandts, 1969). Ainsi, même dans des conditions de faible luminosité ou à l'obscurité, on peut observer la perte d'activité des enzymes du cycle de Calvin comme la Rubisco (Bruggemann et al., 1992; Kingston-Smith et al., 1999; Allen et al., 2000), la sedoheptulose 1,7-biphosphatase ou la fructose 1,6-biphosphatase chloroplastique (Sassenrath et al., 1990; Hutchison et al., 2000).

## Encadré 1 : Rappels sur la photosynthèse

La photosynthèse implique un couplage entre les réactions chimiques d'oxydoréduction sous l'effet de la lumière (c'est la phase photochimique, cf. Figure a) et celles enzymatiques sous la dépendance de la température (c'est la phase chimique, cf. Figure b). C'est le principal mécanisme qui transforme l'énergie lumineuse en énergie potentielle chimique (ATP) utilisable et en énergie potentielle redox (NADPH) grâce aux composants de la membrane des thylakoïdes. Les molécules de NADPH et d'ATP sont alors recrutées dans les puits métaboliques en aval. Le principal puits métabolique est constitué par la réduction du CO<sub>2</sub> à travers le cycle de Calvin (cf. Figure b) pour former des glucides dans le stroma des chloroplastes suivant la formule synthétique suivante :

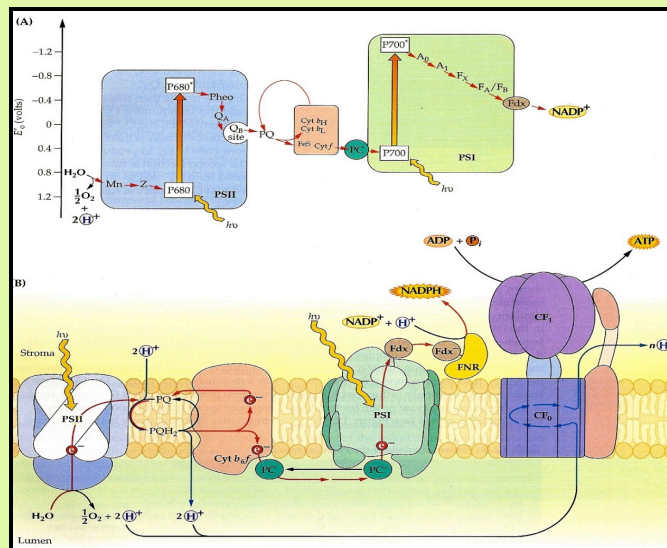


Figure a : Réactions de la phase photochimique de la photosynthèse, montrant les différents transporteurs d'électron avec leur niveau de potentiel redox variable (A), et l'organisation au sein de la membrane des thylakoïdes des différents transporteurs d'électron, ainsi que l'appareil de synthèse d'ATP (B) (Malkin and Niyogi, 2000).

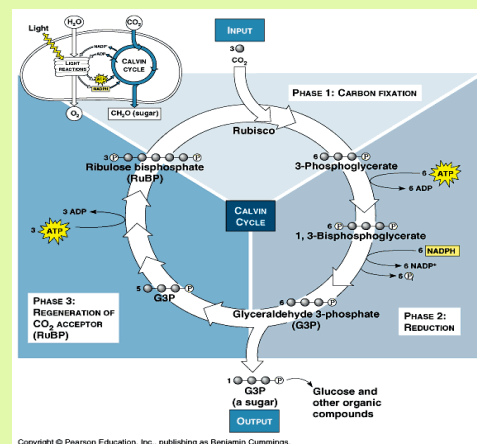


Figure b : Schématisation partielle du cycle de Calvin (source : [http://www.msu.edu/~smithe44/calvin\\_cycle\\_process.htm](http://www.msu.edu/~smithe44/calvin_cycle_process.htm)).

L'absorption de la lumière pour la photosynthèse se fait par les complexes protéiques collecteurs de lumière (LHC ou Light Harvesting Complex, cf. Figure c) qui sont associés aux centres de réaction du photosystème I (PSI) et du photosystème II (PSII) (cf. Figure d).

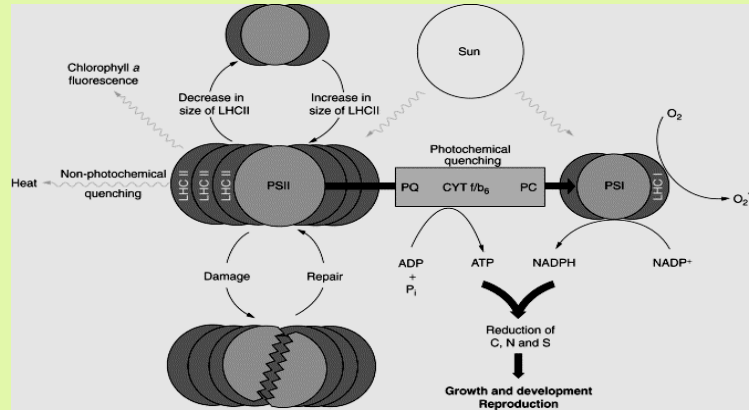


Figure c : Transformation photosynthétique de l'énergie lumineuse et mécanismes de maintien de l'équilibre énergétique (Huner et al., 1998).

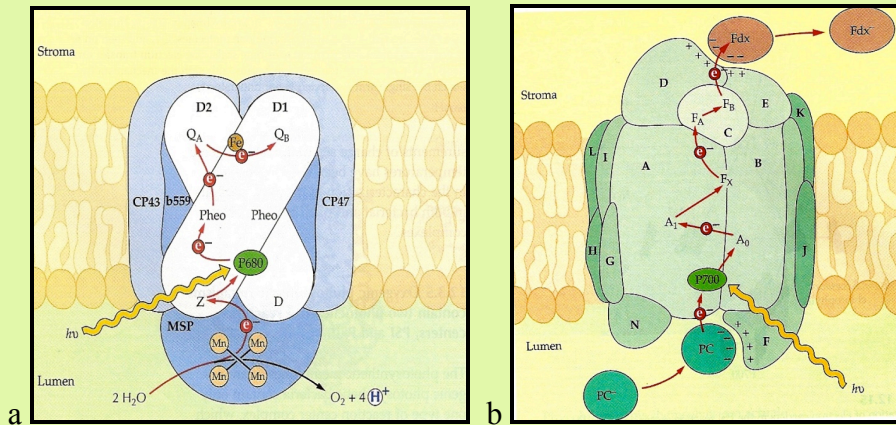
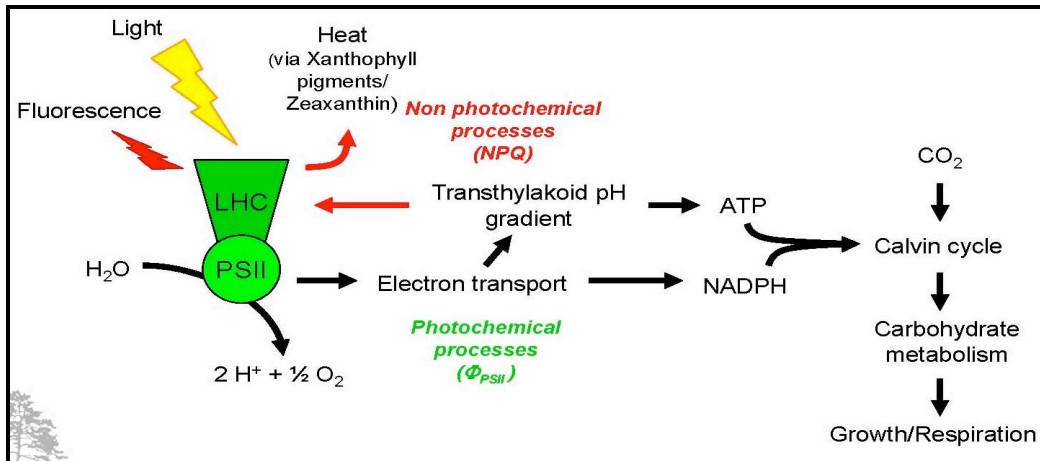
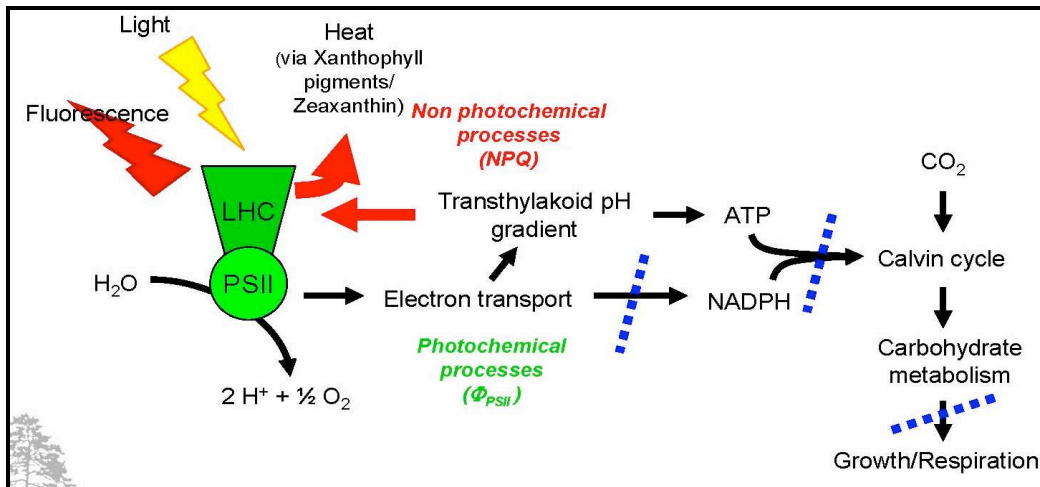


Figure d : Modèles structuraux du PSII et du PSI. D'après Malkin et Niyogi (2000) : a) le transfert d'électrons depuis les molécules d'eau jusqu'aux plastoquinones  $Q_A$  et  $Q_B$ , en passant par la phéophytine (Pheo) ; b) les différentes sous-unités protéiques et le transfert d'électrons depuis, de la chlorophylle P700 jusqu'à la ferredoxine (Fdx) :  $A_0$ = chlorophylle a ;  $A_i$ =phyloquinone ;  $F_x$ ,  $F_A$  et  $F_B$  sont des protéines à centre Fe-S.

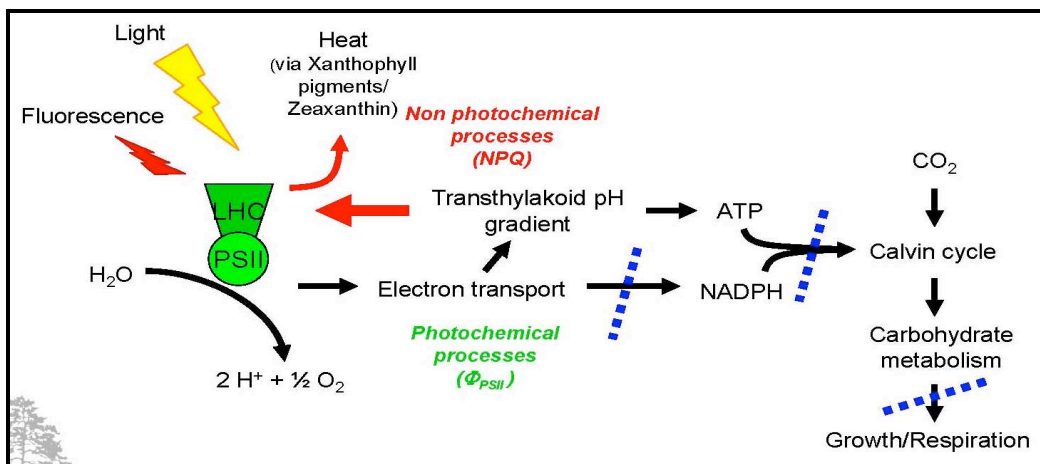
Pour que la photosynthèse se déroule de façon optimale, les facteurs environnementaux tels que la température, l'intensité et la qualité de la lumière incidente doivent être optimaux, et la disponibilité en eau, en nutriments et en dioxyde de carbone doit être assurée (Taiz and Zeiger, 2006).



a)



b)



c)

Figure II-4 : Schématisation des différents processus de la photosynthèse en condition normale et sous stress froid.

En a) les différents processus photochimiques et d'assimilation du carbone sont en équilibre et en bonne efficacité (on voit peu d'émission de fluorescence et de chaleur); dans le cas du stress froid qui perturbe la phase chimique (pointillés bleus), la plante essaie de se préserver des effets létaux en augmentant les processus non photochimiques (b) ou en réduisant la taille des centres collecteurs de lumière (LHC) et la section d'absorption du PSII (c). Copyright Ingo Ensminger (2007) ; Max Planck Institute, Allemagne ; document personnel de présentation aux étudiants)

## **b. La cristallisation de l'eau dans les cellules**

Un des soucis majeurs rencontrés par les plantes subissant des basses températures tient au fait que la plupart des systèmes biologiques sont composés d'eau en grande quantité. Cette eau est susceptible de geler lorsque la température descend en dessous d'un certain seuil. Lorsque les cellules végétales gèlent, les cristaux de glace se forment à l'intérieur ou à l'extérieur de la paroi cellulaire. Le gel intracellulaire est catastrophique pour les cellules, car il désorganise les structures cellulaires et provoque la mort (Burke et al., 1976). Les plantes qui supportent les températures gélives, subissent une formation de glace à l'extérieur des cellules afin d'éviter le gel intracellulaire.

## **4. La nucléation de la glace**

### **a. Généralités**

La formation de glace (à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules) passe par la **nucléation**. C'est la formation d'un petit noyau d'une nouvelle phase solide dans une solution aqueuse ; c'est donc le point de départ de la congélation. En absence de toute substance de nucléation, l'eau pure gèle spontanément à environ  $-38^{\circ}\text{C}$ . C'est la température de **nucléation homogène** de l'eau pure (Rasmussen and McKenzie, 1972). La glace peut se former soit par déshydratation lorsque les minéraux cristallisent dans une solution saturée, soit par congélation lorsque l'eau cristallise.

Les plantes gèlent lorsqu'elles sont incapables d'éviter la nucléation et d'empêcher la propagation de la glace (Levitt, 1980; Franks, 1981; Pearce, 2001). Une fois la nucléation enclenchée, la glace se propage rapidement dans la plante, spécialement via les tissus vasculaires. Les dommages résultant de cette formation de glace sont soit physiques, soit chimiques, ou une combinaison des deux (Gusta et al., 2003). Certaines barrières naturelles telles que les cuticules épaisses peuvent empêcher l'entrée de la glace dans les cellules. Les plantes peuvent produire aussi certains facteurs qui inhibent la formation ou la croissance de la glace. C'est le cas des polysaccharides pariétaux chez les céréales, et surtout des protéines antifreeze (AFP, Griffith and Antikainen, 1996).

Les tests artificiels donnent souvent des températures de nucléation plus basses que celles observées dans des conditions naturelles, ce qui démontre le rôle important des éléments naturels (non contrôlables) au champ (Ashworth et al., 1985; Flinn and Ashworth,

1994). Pour étudier les mécanismes biophysiques de formation et de propagation du gel dans les plantes, on utilise différentes techniques :

- L'analyse thermique différentielle (Differential Thermal Analysis : DTA)
- L'analyse calorimétrique différentielle (Differential Scanning Calorimetry : DSC)
- La résonance magnétique nucléaire
- Les thermocouples
- La thermographie infrarouge (Infrared Video Thermography : IRVT)

Certains facteurs induisent la nucléation à des températures bien supérieures à la température de nucléation homogène de l'eau. Ce sont des nucléateurs ou agents de nucléation de la glace (INA, Ice Nucleating Agent). Pour pouvoir être actifs, les nucléateurs doivent impérativement être hydratés. Les plantes humides sont donc plus susceptibles de geler (Wisniewski et al., 1997; Fuller and Wisniewski, 1998).

#### **b. Les agents de nucléation de la glace**

Les INA sont soit intrinsèques aux cellules, soit en provenance du milieu extérieur :

- Les nucléateurs intrinsèques peuvent être adaptatifs ou secondaires. Lorsqu'ils sont adaptatifs, il s'agit généralement de grosses protéines qui ont pour rôle de favoriser la nucléation hétérogène, induite par la cellule elle-même (dans le but de choisir les endroits où la formation de la glace lui causera le moins de dommage), alors que les secondaires, comme des débris ou même la paroi cellulaire provoquent la nucléation par un mécanisme non contrôlé (non désiré) par la cellule. Les nucléateurs intrinsèques sont très répandus chez les arbres. Ceux trouvés chez les plantes sensibles au gel sont forcément secondaires, puisqu'ils causent leur mort quand ils agissent (Lundheim, 2002).
- Les nucléateurs extrinsèques sont la plupart du temps des bactéries telles que *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* (Gusta et al., 2003) qui peuvent coloniser les plantes et induire la nucléation à des températures juste en dessous de zéro. Ces bactéries agissent via des protéines, des phospholipides membranaires, ou d'autres éléments qui sont essentiels à leur activité. Ces éléments participeraient à l'organisation de l'eau

en cristaux (Lundheim, 2002). La lutte contre ces bactéries (non pas à cause de leur pathogénicité, mais à cause de leur rôle de facilitation de la nucléation) passe par l'utilisation de bactéricides ou de compétiteurs qui sont des bactéries naturelles ou modifiées par génie génétique, ce qui permet de réduire significativement leurs populations. Le gel des plantes herbacées à des températures proches de zéro, est principalement dû aux nucléateurs extrinsèques (Wisniewski et al., 2001).

Certains autres facteurs comme la gelée blanche (formation de glace à l'extérieur des organes à partir des vapeurs d'eau contenues dans l'air) peuvent aussi provoquer la nucléation via des voies d'entrée comme les stomates ou les blessures (Burke et al., 1976).

### **c. Les effets sur la membrane plasmique**

La membrane plasmique est un élément très important dans la réaction des cellules face aux basses températures. Il a été montré que chez les plantes résistantes au gel, non seulement la membrane plasmique, mais également la paroi cellulaire agissent comme une barrière contre la propagation de la glace extracellulaire (Yamada et al., 2002). En fonction de la limite de résistance de la plante, l'effet mécanique de la formation de glace entre les cellules peut être désastreux lorsque la membrane se rompt.

L'aspect fané observé chez les feuilles ayant subi du gel traduit une perte importante d'eau qui s'accompagne d'une fuite d'électrolytes vers l'extérieur des cellules. Ceci résulte de transitions de phase dans les lipides membranaires du plasmalemmes, ce qui augmente la perméabilité de celui-ci (Lyons, 1973).

Des différences significatives dans le « cryo-comportement » de la membrane plasmique végétale ont été observées avec des protoplastes isolés de feuilles d'espèces herbacées (Uemura et al., 2006). Ces différences sont fonction du niveau de tolérance de la plante et de l'intensité de la déshydratation induite par le gel (cf. Figure II-5) :

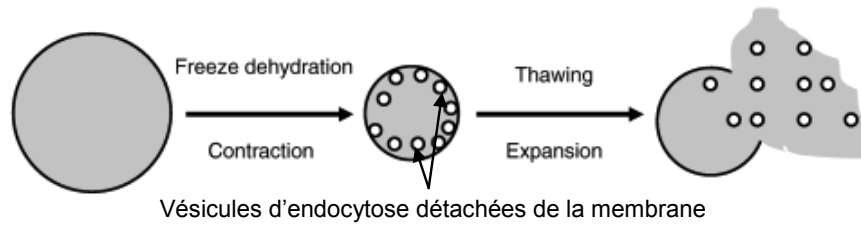
- Chez les cellules avec une tolérance très limitée, la déshydratation induite par le gel se traduit par deux types de lésion dans la membrane plasmique :
  - Dans des conditions de déshydratation moyenne mais préjudiciable, les protoplastes sont incapables de se dilater pendant la phase de dégel ; ceci est dû à l'absence des vésicules libérées sous l'effet de la contraction osmotique

provoquée par le gel. Les protoplastes se lysent donc et présentent un type de lésion particulier appelé « Expansion-Induced Lysis » (EIL, cf. Figure II-5A).

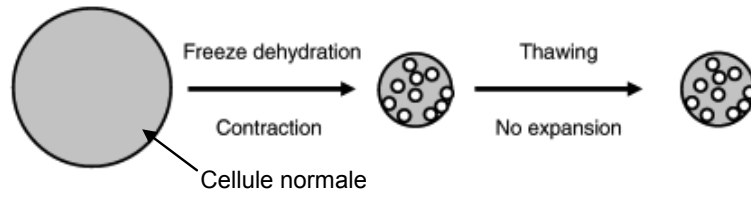
- Lorsque la déshydratation est plus sévère (abaissement plus marqué de la température), le volume des protoplastes se réduit considérablement et ces derniers perdent leur réponse osmotique pendant le dégel. Le type de lésion provoqué est appelé « Loss of Osmotic Responsiveness » (LOR, cf. Figure II-5B) ; c'est la conséquence de la formation de phases hexagonales II ( $H_{II}$ ) dans les zones de contact de la membrane plasmique avec diverses membranes de composants internes (enveloppe chloroplastique la plupart du temps) suite à la perte considérable d'eau vers la glace extracellulaire. Une phase hexagonale II est une conformation de la membrane plasmique (visible au microscope) induite par les interactions entre les lipides membranaires où un déséquilibre en faveur des parties hydrophobes entraîne la formation de cylindres de symétrie hexagonale constitués de canaux aqueux vers lesquels les têtes polaires des lipides s'orientent (Schechter, 1997).
- Chez les cellules tolérantes, la contraction osmotique induite par le gel entraîne des extrusions exocytotiques plutôt que des vésicules endocytotiques. Ces vésicules reliées à la membrane, montrent que l'étendu de la surface membranaire est conservé pendant la déshydratation. En conséquence, pendant le dégel, ces extrusions sont réincorporées dans la membrane, ce qui empêche l'obtention de lésions EIL quelle que soit l'intensité de la baisse de la température. Lorsqu'il y a des lésions, elles sont de type LOR avec formation de FJL (Fracture-Jump Lesion).



**A** Expansion-induced lysis (EIL) with endocytotic vesiculation



**B** Loss of osmotic responsiveness with endocytotic vesiculation and H<sub>II</sub> phase (LOR-H<sub>II</sub>)



**C** Loss of osmotic responsiveness with exocytotic extrusions and the fracture-jump lesion (LOR-FJL)

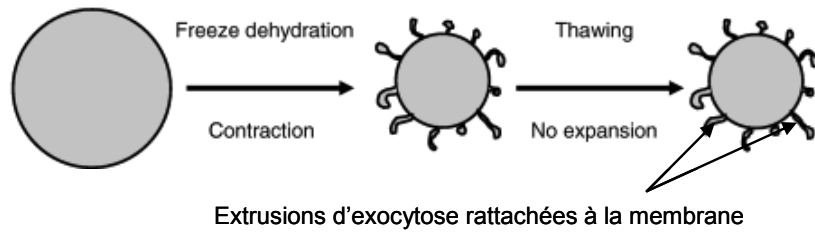


Figure II-5 : Lésions causées par le gel à la membrane plasmique de protoplastes isolés.  
Adapté de Uemura et al. (2006).

## B. Les stratégies d'adaptation des plantes face au gel : évitement et tolérance

Pour survivre au gel, les plantes disposent de deux stratégies qui ne s'excluent pas mutuellement, mais dont l'importance varie en fonction de l'espèce concernée : **l'évitement** ou **la tolérance** (Sakai and Larcher, 1987).

### 1. Les différentes stratégies d'évitement

#### a. L'évitement cellulaire (**freezing avoidance**)

Il concerne principalement certaines espèces ligneuses des régions tempérées et boréales. Il permet à ces espèces de tolérer des températures très négatives. On distingue deux mécanismes biophysiques principaux, qui s'opposent :

- **La surfusion accentuée (deep supercooling)** : elle se produit dans certains tissus (en particulier le xylème et les bourgeons floraux) de la plupart des espèces forestières à feuilles caduques et des arbres fruitiers (Quamme et al., 1982; Ashworth et al., 1988; Malone and Ashworth, 1991). Pendant des périodes pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines, les cellules de ces tissus maintiennent leur milieu intracellulaire à l'état liquide sans mouvement de l'eau vers l'extérieur. Elles peuvent donc survivre à des températures avoisinant  $-40^{\circ}\text{C}$ . C'est la limite du mécanisme, qui correspond à la température à laquelle l'eau gèle spontanément ( $-38.1^{\circ}\text{C}$ ). Cependant, dans certains cas, la surfusion profonde peut descendre en dessous de  $-40^{\circ}\text{C}$ , grâce à l'abaissement du point de congélation, qui est fonction du taux de solutés présents dans la cellule. Pour que la surfusion ait lieu, la cellule doit posséder une barrière (paroi) infranchissable, ne permettant ni la fuite de l'eau intracellulaire, ni la propagation de la glace extracellulaires vers l'intérieur, et être dépourvue d'agents intrinsèques de nucléation. On n'observe donc pas de déshydratation des cellules dans ce cas précis alors même qu'il y a présence de glace dans l'espace extracellulaire. Par contre, et c'est le côté négatif du mécanisme, lorsque le point de congélation est atteint (limite du système), la nucléation peut être initiée dans les cellules, ce qui les désagrège très rapidement.
- **La vitrification (glass formation)** : ce phénomène se produit par exemple chez le peuplier, où par un refroidissement lent (la vitesse de refroidissement doit être

inférieure à 5°C/h) la solution intracellulaire se vitrifie à environ -28°C (Hirsh et al., 1985). Grâce à cette vitrification, certains types de plantes peuvent ainsi supporter des températures encore plus basses que celles rencontrées dans le cas de la surfusion profonde. Des expériences au laboratoire ont permis de constater que des cellules dans lesquelles se produit la vitrification peuvent tolérer une température aussi basse que celle de l'azote liquide (-196°C). Sous l'effet d'une forte déshydratation, les cellules de ces plantes modifient la composition de leur cytosol pour former des verres au lieu de cristalliser, par exemple en dégradant l'amidon en sucres. Ces cellules sont donc en quelque sorte figées. Plus la teneur en sucres est élevée, plus vite a lieu la vitrification. Grâce à ce mécanisme une déshydratation importante peut être surmontée. La vitrification permet de protéger les polypeptides de la dénaturation. Elle empêche que la déshydratation ne se prolonge vers un niveau irréversible pour les cellules.

#### **b. L'évitement développemental ou échappement (freezing escape)**

Une autre stratégie d'évitement pour la plante consiste à décaler les stades de développement les plus sensibles (e.g. la floraison), pour les soustraire aux effets des basses températures. En effet la sensibilité au gel augmente après l'initiation florale (Fowler et al., 2001). De façon générale, pour maximiser le succès de leur reproduction, les plantes peuvent développer des mécanismes complexes pour permettre la floraison uniquement en conditions favorables. Et ainsi des facteurs génétiques existent pour coordonner la floraison avec des variables environnementales telles que la photopériode (longueur du jour), la température, la qualité de la lumière ou la disponibilité des nutriments (Martinez-Zapater et al., 1994). Dans la nature, ces facteurs sont principalement liés au passage à la saison hivernale au cours de laquelle la longueur du jour diminue et la température baisse considérablement, et les plantes évitent de fleurir en attendant des conditions meilleures au printemps et en été.

Chez le pois par exemple, certaines variétés fourragères possèdent cette caractéristique d'échappement au gel, car elles sont capables de retarder leur initiation florale, stade fortement sensible au gel, sous l'action des jours courts (Lejeune-Hénaut et al., 1999). Semés à l'automne, ces pois fourragers restent à l'état végétatif jusqu'au printemps suivant, ce qui leur permet d'échapper aux principales périodes hivernales de gel. C'est le locus majeur *Hr* (Murfet, 1973) qui contrôle cette réaction à la photopériode. Outre la soustraction de la phase

de floraison aux effets des basses températures, le fait de retarder cette floraison permet également d'augmenter la production de biomasse en augmentant la durée du cycle de la plante.

Chez *Arabidopsis thaliana*, des voies génétiques complémentaires contrôlent la transition vers l'initiation florale (Figure II-6). Les jours longs par exemple, favorisent la floraison en activant le facteur de transcription CONSTANS (CO) (Suarez-Lopez et al., 2001). Par ailleurs, la floraison chez *Arabidopsis thaliana* est également contrôlée par un répresseur principal synthétisé par le locus *FLC* (FLOWERING LOCUS C, Michaels and Amasino, 1999; Henderson and Dean, 2004). Le gène *FLC* est réprimé (pour permettre la floraison) par une exposition de la plante à une période prolongée de froid, un phénomène connu sous le nom de vernalisation. Dans la nature, cette période prolongée de froid correspond à l'hiver. Pendant la période de froid, la plante reste à l'état de rosette. *FLC* est régulé de façon épigénétique, car une fois l'état de vernalisation acquis par la plante, le gène reste à l'état réprimé sans modification dans sa séquence. Cette régulation épigénétique implique d'autres gènes de floraison comme *FVE* qui agissent sur l'état d'acétylation des histones de la chromatine.

Chez les céréales la vernalisation joue également un rôle déterminant (Trevaskis et al., 2003; Yan et al., 2003; Yan et al., 2004). La MADS-Box protéine *VRN1* fonctionne comme un activateur de la floraison et a une homologie avec *APETALA1* (Yan et al., 2003). La protéine *VRN2* quant à elle contient un domaine CCT de 43 acides aminés, qui a une homologie avec les protéines CO, CO-LIKE et TOC1 d'*Arabidopsis thaliana* (Figure II-6), mais son rôle est de réprimer directement ou indirectement l'expression de *VRN1* (Yan et al., 2004). C'est là qu'intervient la vernalisation pour réduire progressivement le niveau d'expression de *VRN2* et ainsi permettre le passage à la floraison.

Chez les céréales comme chez *Arabidopsis thaliana*, on a pu montrer que les gènes qui gouvernent les besoins en vernalisation et/ou la réponse à la photopériode sont également des régulateurs de la durée d'expression de gènes de tolérance au gel, justement par le biais du contrôle de la date de passage de l'état végétatif à l'état reproducteur (Fowler et al., 1996a; Fowler et al., 2001; Mahfoozi et al., 2001; Kim et al., 2004), ce qui montre que les stratégies d'évitement et de tolérance peuvent être très liées.

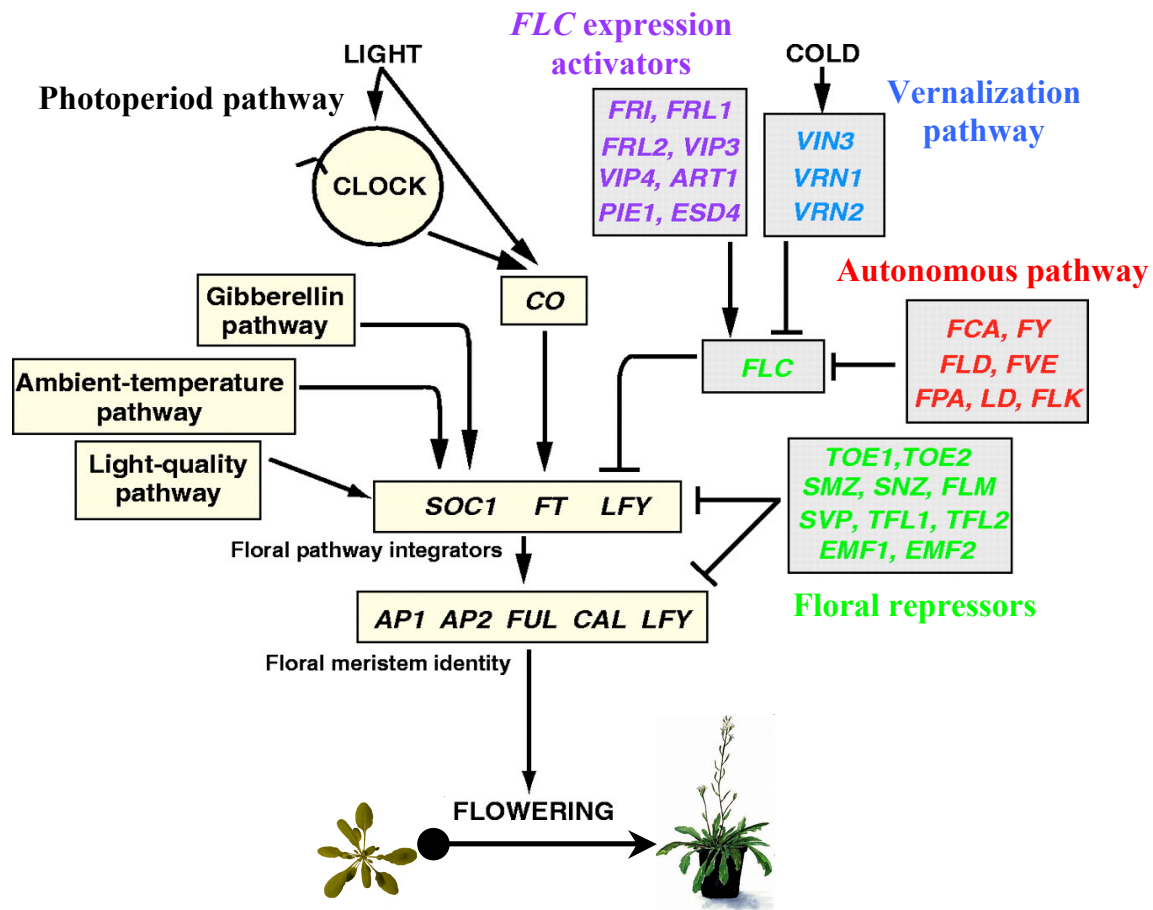


Figure II-6 : Les différentes voies contrôlant la floraison chez *Arabidopsis thaliana*.  
Adapté de Henderson et Dean (2004).

AP : APETALA ; ART1 : AERIAL ROSETTE1 ; CAL : CAULIFLOWER ; CO : CONSTANS ; EMR : EMBRYONIC FLOWER ; ESD4 : EARLY UNDER SHORT DAYS4 ; FLC : FLOWERING LOCUS C ; FRI : FRIGIDA ; FRL : FRIGIDA-LIKE ; FUL : FRUITFULL ; LD : LUMINDEPENDENS ; LFY : LEAFY ; PIE1 : PHOTOPERIOD INSENSITIVE EARLY FLOWERING1 ; SMZ : SCHLAFMUTZE ; SNZ : SCHNARCHZAPFEN ; SOC : SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS ; SPV : SHORT VEGETATIVE PHASE ; TLF : TERMINAL FLOWER ; TOE : TARGET OF EAT ; VIN3 : VERNALIZATION INSENSITIVE3 ; VIP : VERNALIZATION INDEPENDENCE ; VRN : VERNALIZATION

## 2. La tolérance au gel

L'acquisition de la résistance au gel ou de la tolérance au gel est le mécanisme le plus répandu développé par les plantes pour survivre au stress gel. Les notions de résistance et de tolérance diffèrent légèrement. Alors que la résistance suppose que la plante n'est quasiment pas touchée par les dégâts de gel, la tolérance peut être décrite comme l'aptitude à résister au développement de lésions dues au gel et la capacité de reprise de la croissance végétative et du développement après le retour à des températures optimales (Lyons, 1973). Mais ces deux termes sont souvent utilisés l'un pour l'autre par les différents auteurs étudiant la réponse des plantes au gel. Dans ce manuscrit, j'ai choisi d'utiliser le terme de tolérance au gel, parce que je n'ai quasiment jamais observé de résistance complète sur les plantes que j'ai étudiées.

### a. La tolérance au gel au niveau de la plante entière

La tolérance au gel est le résultat d'une réponse complexe au stress, qui implique de multiples changements physiologiques, biochimiques et moléculaires (Weiser, 1970; Levitt, 1980). Cette réponse est déclenchée ou amplifiée par des facteurs environnementaux dont les signaux permettent aux plantes d'anticiper l'arrivée des températures négatives et donc de s'y préparer en contrôlant l'acquisition de la tolérance au gel. La plupart des plantes des régions tempérées augmentent leur niveau de tolérance au gel en réponse aux basses températures positives, par le biais d'un processus appelé **acclimatation au froid** (Thomashow, 1999). De plus, pour beaucoup de ces espèces, les photopériodes courtes peuvent également augmenter la tolérance au gel (Fowler et al., 2001; Welling et al., 2002).

Expérimentalement, le développement de la tolérance au gel peut également être induit par d'autres stress osmotiques comme la déshydratation (Siminovitch and Cloutier, 1982; Li et al., 2002) ou une forte salinité (Ryu et al., 1995), ainsi que par un traitement par l'acide abscissique (ABA, Chen and Gusta, 1983; Nagao et al., 2005; Sanjeeva et al., 2006).

Le niveau de tolérance au gel obtenu grâce à l'acclimatation au froid n'est pas statique, mais varie au cours de la saison. De plus, la tolérance peut rapidement être perdue par un retour à des températures élevées : c'est la désacclimatation. Alors que les plantes peuvent mettre plusieurs semaines à s'acclimater au froid, il suffit de quelques heures à quelques jours de retour à des températures élevées pour qu'elles perdent leur état d'acclimatation. Cependant les plantes tolérantes au gel conservent quand même un certain niveau de tolérance qui leur permet de se réacclimater assez rapidement lorsque la température baisse de nouveau (Guy, 1990).

Outre la tolérance au gel induite par l'acclimatation au froid, certaines plantes peuvent également devenir tolérantes sans acclimatation préalable, après une baisse rapide de la température en dessous de 0°C (Hannah et al., 2006). Le processus de la mise en place de la tolérance sans acclimatation n'est pas très bien connu, mais il a été montré chez la pomme de terre (Stone et al., 1993) et chez le colza (Teutonico et al., 1995) qu'elle peut être déterminée génétiquement par des loci indépendants de la tolérance par acclimatation.

## b. Les aspects biophysiques de la tolérance au gel au niveau cellulaire

Pour se protéger de la congélation intracellulaire létale, la plupart des plantes favorisent la formation de la glace extracellulaire. Ce phénomène protège la plante de deux façons :

- en relargant de la chaleur latente dans les cellules, évitant ainsi une baisse trop rapide de leur température ;
- en drainant de l'eau vers l'extérieur des cellules, sous l'effet de la pression de vapeur exercée par la glace dans le compartiment extracellulaire ; cette sortie d'eau provoque la déshydratation et augmente ainsi la concentration en solutés du cytoplasme, ce qui abaisse le point de congélation de l'eau cellulaire ; c'est la raison pour laquelle, en l'absence de formation de cristaux de glace intracellulaires, les stress dus au gel ont des effets similaires aux stress hydriques ; cependant, peu d'espèces agronomiquement importantes peuvent abaisser leur point de congélation de plus de 4°C (en général entre 1 et 2°C ; Levitt, 1980) ; si le réchauffement intervient progressivement, les cellules peuvent réabsorber l'eau et reprendre leur état normal.

Presque toutes les plantes sont capables de faire de la **surfusion (supercooling)**. La surfusion est un phénomène par lequel une solution aqueuse reste à l'état liquide alors que la température diminue en dessous de son point de congélation. Cette surfusion ne peut avoir lieu qu'en l'absence d'agent de nucléation de la glace. Le degré de surfusion dont est capable une plante est fonction de son espèce, des conditions environnementales et du stade de développement. Le taux d'hydratation des tissus joue aussi un rôle très important dans le niveau de résistance atteint. Dans les tissus très hydratés de certaines espèces herbacées, lorsque le refroidissement est rapide, l'eau intracellulaire n'a pas le temps de migrer vers l'espace extracellulaire et les sites de cristallisation de l'eau ; les tissus peuvent alors subir une congélation de l'eau à l'intérieur des cellules, ce qui leur sera létal.

La survie des cellules soumises à la formation de glace extracellulaire dépend largement du niveau de tolérance à la déshydratation provoquée. Les températures auxquelles ces cellules peuvent survivre varient aussi en fonction des espèces (Sakai, 1960; Sakai and Larcher, 1987). C'est ainsi que certaines espèces herbacées telles que certaines céréales

d'hiver peuvent résister à la présence de glace extracellulaire jusqu'à des températures inférieures à -25°C.

La température à laquelle la nucléation extracellulaire a lieu est importante dans la détermination du niveau de tolérance au gel de la plante, surtout lorsque le mécanisme de surfusion est en cours. Rajashekar et al. (1983) ont constaté que chez *Solanum acaule*, la LT<sub>50</sub> (lethal temperature 50, c'est-à-dire la température à laquelle on obtient 50% de fuite d'électrolytes) des feuilles est de -7°C lorsque la nucléation a lieu à -1°C, alors qu'en permettant aux feuilles de faire de la surfusion jusqu'à -2°C avant la nucléation, elles sont tuées par une température de -3°C. Les collets de plantes de blé d'hiver acclimatées au froid, et nucléés à -3°C peuvent tolérer jusqu'à -24°C, mais sont endommagés si la nucléation est initiée à -6°C (Gusta et al., 2003). Les raisons pour lesquelles certains tissus ne supportent pas un niveau important de surfusion avant nucléation peuvent être liées à la teneur en eau, l'architecture et le mouvement d'eau à travers la membrane plasmique (Gusta et al., 2003). En réalité, le refroidissement très lent comme très rapide peut endommager les cellules (Lundheim, 2002). La plante doit donc trouver un rythme de refroidissement optimal. En initiant la nucléation extracellulaire à une température modérée, la plante peut ainsi optimiser la vitesse de formation de la glace lui permettant de protéger son milieu intracellulaire.

## **C. L'acclimatation au froid : mécanismes et régulation**

### **1. Les facteurs environnementaux déclenchant l'acclimatation au froid**

Différents facteurs environnementaux participent à la mise en place de l'acclimatation au froid. Si la baisse de la température et les photopériodes courtes constituent les principaux facteurs, d'autres tels que la lumière interviennent également dans le phénomène.

Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, les basses températures seules suffisent à déclencher le processus d'acclimatation et on peut distinguer des différences entre les besoins en lumière et en basse température pour une augmentation de la tolérance au gel (Gilmour et al., 1988; Kurkela et al., 1988; Wanner and Junttila, 1999). Le rôle de l'énergie lumineuse dans le processus d'acclimatation au froid chez *Arabidopsis thaliana* se situe principalement dans la fixation photosynthétique du carbone, nécessaire pour l'accumulation du saccharose et des autres solutés (Wanner and Junttila, 1999). Le processus d'acclimatation au froid est très rapide chez *Arabidopsis thaliana*, car une augmentation de la tolérance au gel peut être observée dès 12 heures de traitement au froid à 4°C (Gilmour et al., 1988). Un maximum de



tolérance au gel autour de  $-10^{\circ}\text{C}$  peut être atteint pour des plantes soumises à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant une semaine. Cependant la désacclimatation est aussi rapide. En l'espace d'un jour, si les plantes sont de nouveau soumises à des températures optimales, elles perdent la tolérance au gel maximale précédemment acquise et peuvent être tuées par une température de  $-7^{\circ}\text{C}$  (Wanner and Junttila, 1999). Le niveau de tolérance au gel chez *Arabidopsis thaliana* n'est pas le même à tous les niveaux de la plante : les plus jeunes feuilles au centre de la rosette développent la tolérance au gel plus rapidement que les plus vieilles et les cotylédons sont eux complètement incapables d'augmenter leur tolérance au gel (Wanner and Junttila, 1999).

Chez les céréales d'hiver, l'obtention d'un niveau maximal de tolérance (jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$ ) dépend de deux éléments : la vernalisation et la photopériode (Fowler et al., 1996a; Fowler et al., 1996b; Danyluk et al., 2003; Limin and Fowler, 2006). Une photopériode courte empêche le passage de la phase végétative à la phase reproductrice, et ce faisant, permet de maintenir un niveau élevé d'expression des gènes de réponse au froid. Autrement dit, l'expression maximale des gènes de réponse au froid ne se produit que pendant la phase végétative ; *a contrario* pendant la phase reproductrice, les plantes possèdent une capacité très limitée d'acclimatation au froid. Dans le cas des céréales d'hiver, le développement à basse température est un pré-requis pour une bonne acclimatation au froid. C'est ainsi que des feuilles complètement développées à  $20^{\circ}\text{C}$  vont geler pendant l'hiver et que la tolérance finale au gel n'est obtenue qu'avec les feuilles qui se sont développées à  $4^{\circ}\text{C}$  (Huner et al., 1989).

Dans le cas des arbres, le processus d'acclimatation au froid se déroule en deux étapes : la première étape est déclenchée par la diminution de la photopériode et la seconde par l'abaissement de la température (Weiser, 1970; Cameron and Dixon, 2000; Gomez et al., 2005; Li et al., 2005). Cependant ces deux éléments peuvent influencer sur l'acclimatation au froid de façon indépendante et additive (Johnson and Havis, 1977; Welling et al., 2002). La photopériode joue un rôle central comme signal primaire induisant l'arrêt de la croissance et le développement de la dormance, et elle initie l'acclimatation au froid. L'exposition ultérieure aux basses températures est le facteur principal nécessaire à l'augmentation de la tolérance au gel. Chez les arbres à feuilles caduques (e.g. le peuplier), la mise en place de la tolérance au gel est un processus plutôt lent, mais qui se traduit au final par un haut niveau de tolérance au gel (Sakai and Larcher, 1987; Rinne et al., 1998). Et tout comme les bourgeons et les troncs, les feuilles peuvent aussi répondre au raccourcissement de la photopériode et à la baisse de la température en augmentant leur tolérance (Li et al., 2002).

Dans la suite de ce chapitre je vais uniquement développer la composante « température » de l'acclimation au froid car c'est la plus étudiée comparativement à la photopériode.

## 2. Les principaux mécanismes physiologiques et biochimiques de l'acclimation au froid

L'acclimation implique une combinaison complexe de changements induits par les différents signaux environnementaux décrits précédemment. Ces changements affectent de nombreuses fonctions cellulaires (Figure II-7).

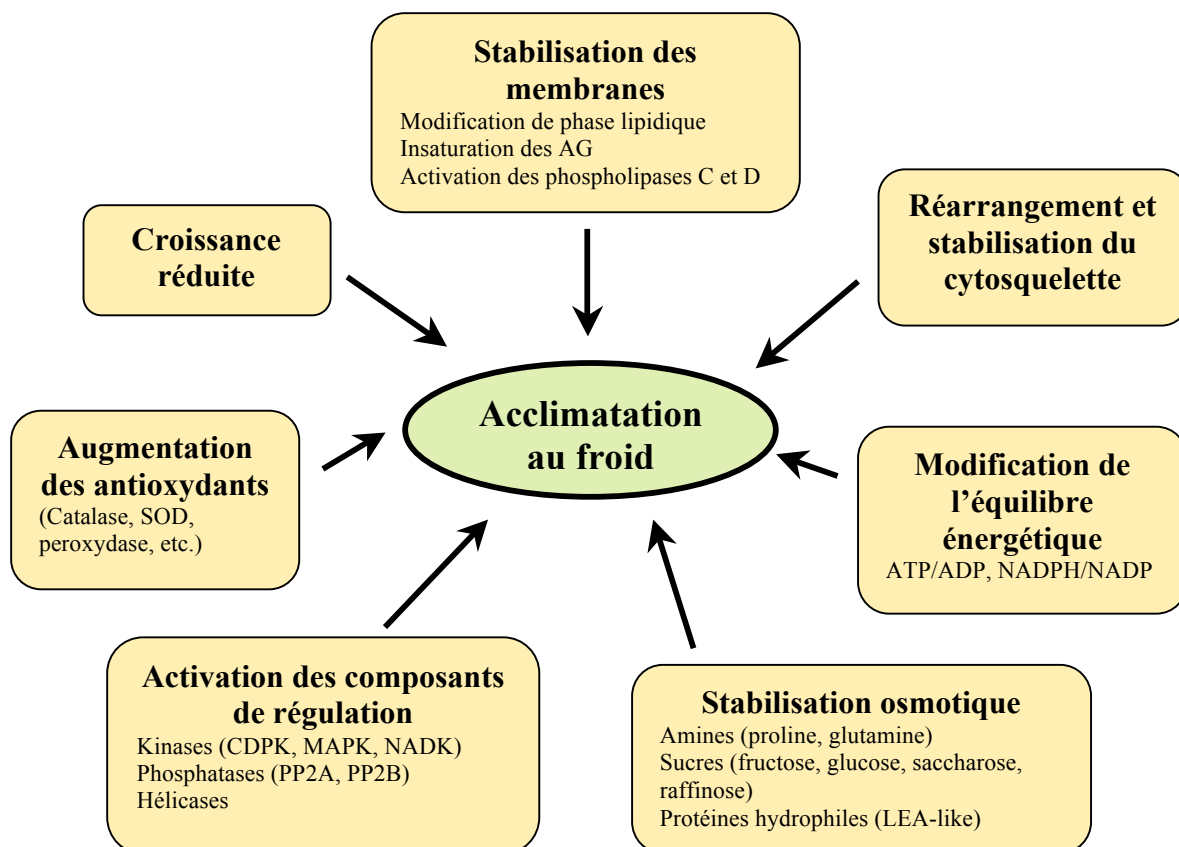


Figure II-7 : Modifications adaptatives et protectrices induites par le froid pour l'acclimation. Adapté de Pragma et al. (2005).

Ces différentes modifications seront détaillées progressivement dans la suite de ce chapitre. Pour accomplir ces modifications aboutissant à l'acclimation au froid, le signal froid perçu par la plante passe par une cascade de réactions connue sous le nom de transduction du signal (Figure II-8).

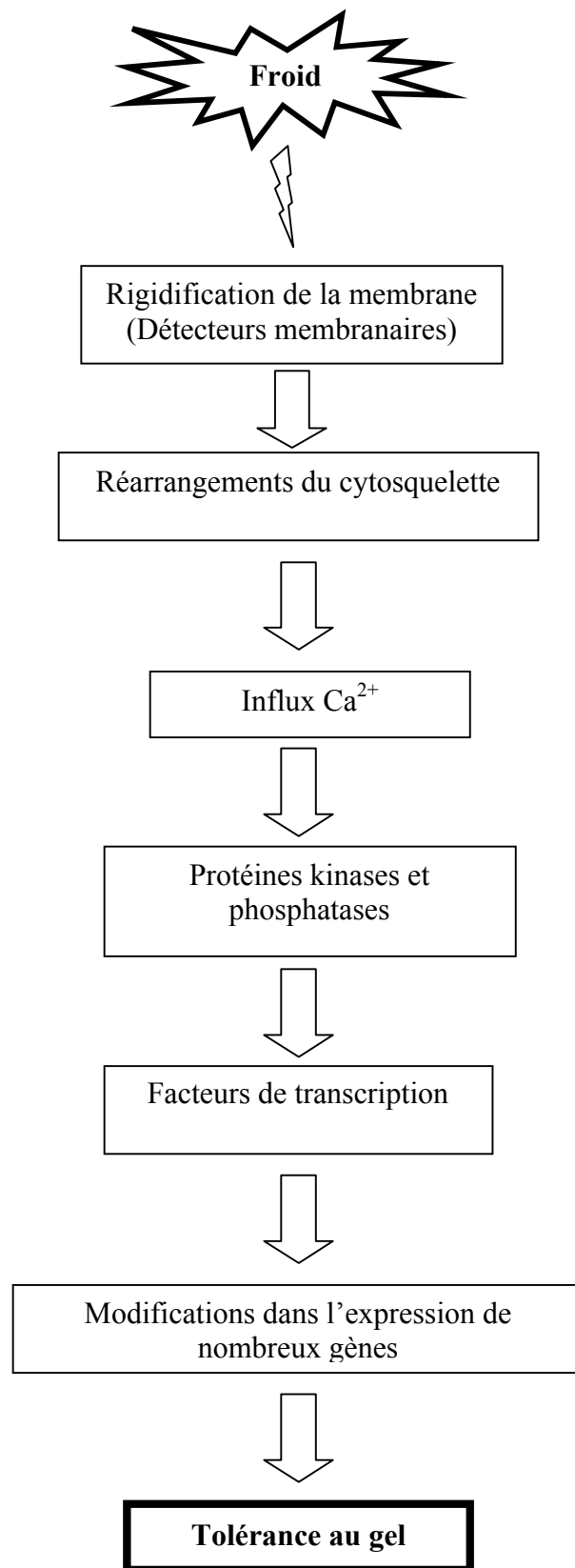


Figure II-8 : Représentation schématique des principales étapes de la réponse au froid

## **a. La transduction du signal froid**

### **α. La perception du signal**

Les mécanismes par lesquels le signal froid est détecté et traduit en réponses biologiques ne sont pas tous bien connus (Komatsu et al., 2007). Cependant, il est largement admis que l'effet immédiat du stress froid chez les plantes est la modification de la fluidité de la membrane plasmique, considérée comme détecteur primaire du signal (Orvar et al., 2000; Sangwan et al., 2002; Nordin Henriksson and Trewavas, 2003; Bubier and Schlappi, 2004). L'équilibre de cette membrane est déterminant pour la survie de la cellule, car toute variation dans sa composition se répercute sur le potentiel d'échange et de nutrition de la cellule. On pense que les changements de fluidité se produisent dans des microdomaines distincts de la membrane plasmique. Des études ont démontré chez la luzerne (*Medicago sativa*) et chez le colza (*Brassica napus*) que cette rigidification, couplée avec des réarrangements du cytosquelette, déclenche les réponses au stress froid (Orvar et al., 2000; Veena et al., 2001; Sangwan et al., 2002). En utilisant une approche pharmacologique, les auteurs ont montré que la rigidification des membranes et la désorganisation des microfilaments d'actine et des microtubules conduisent à une activation de l'acclimatation sans aucun traitement de froid. En effet, l'utilisation de déstabilisateurs chimiques des microfilaments et microtubules comme la latrunculine B, la cytochalasine D, l'oryzaline et la colchicine, ou d'un rigidificateur de la membrane plasmique comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) entraîne l'induction de l'acclimatation au froid à une température de 25°C. A l'inverse, la fluidification des membranes par l'alcool benzylique ou la stabilisation des microfilaments d'actine et des microtubules par la jasplakinolide et le taxol empêchent l'acclimatation pendant un traitement froid à 4°C. Cette transmission du signal froid de la membrane plasmique au cytosquelette s'explique par les liens physiques entre les deux éléments (Encadré 2).

Ding et Pickard (1993) ont montré que l'activité d'un canal calcium mécano-sensitif chez l'oignon augmente avec l'abaissement de la température.

Heino et Palva (2003) ont émis l'hypothèse que les protéines kinases récepteurs-like agissent comme détecteurs du froid. Ces protéines pourraient être activées par un changement de conformation induit par la température au niveau de leurs domaines extracellulaires. Ce qui déclencherait l'activité kinase du côté cytoplasmique des récepteurs. Il a été démontré que les gènes codant les kinases récepteurs-like sont induits en réponse à une baisse de la température

chez *Arabidopsis thaliana* (Hong et al., 1997; Kreps et al., 2002) mais il n'y a pas d'information quant à leur implication dans la détection du froid.

En résumé, on sait que les plantes possèdent une réponse biphasique au froid : un premier groupe de réponses implique un changement dans la fluidité membranaire et un influx de calcium induits par le froid (Komatsu et al., 2007). Le calcium joue alors un rôle de second messenger, en participant au déclenchement du deuxième groupe de réponses dans lequel sont impliquées les protéines kinases et phosphatases régulées par le froid et le calcium (Monroy et al., 1998) et qui activeront à leur tour l'expression de nombreux gènes en aval (Figure II-8).

## Encadré 2 : Quelques rappels sur le cytosquelette et ses relations avec la membrane plasmique

Chez les cellules eucaryotes, l'organisation spatiale et les mouvements dirigés des cellules elles-mêmes ou de leurs organites sont contrôlés par le cytosquelette. Il s'agit d'un réseau filamenteux de polymères protéiques à travers le cytoplasme (Baskin, 2000). Le cytosquelette se compose de trois familles majeures de protéines : les filaments d'actine (assez flexibles et formés d'actine), les filaments intermédiaires (éléments les moins dynamiques du cytosquelette) qui permette l'ancrage des organites, et les microtubules (formés de tubuline, ce sont les éléments les plus rigides du cytosquelette).

Des connexions physiques existent entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Figure a) mais la nature de ces liens n'est pas encore bien connue. Les modifications dans les propriétés physiques de la membrane plasmique entraînent des modifications d'activité de diverses protéines liées à la cette membrane dont les protéines du cytosquelette, et la paroi cellulaire participe à ces interactions (Kacperska, 2004).

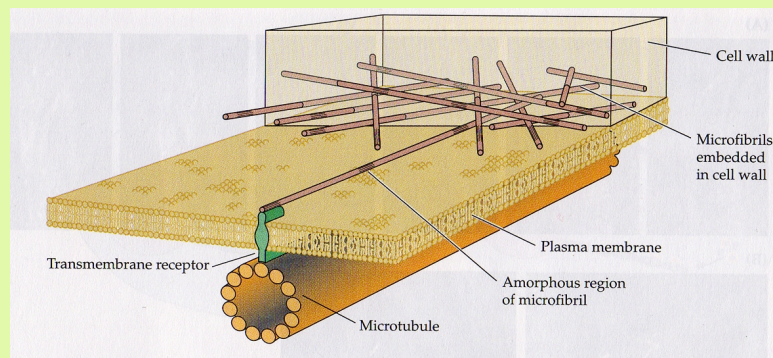


Figure a : Représentation schématique de l'interaction entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Baskin, 2000).

Le cytosquelette est impliqué entre autres dans la régulation de la forme de la cellule et le maintien de sa structure interne, aux communications inter-cellulaires et avec l'extérieur (qui permettent à la cellule de réagir à divers signaux, spécialement les stimuli mécaniques via la paroi), le transport de protéines ou d'ARNm, ou en encore dans la division cellulaire (Baluska et al., 2003; Pokorna et al., 2004).

Dans le cas du froid, le cytosquelette se révèle très sensible aux basses températures non gélives, entraînant une dépolymérisation réversible des microtubules et des filaments d'actine en sous-unités ; mais cette sensibilité varie en fonction des espèces végétales et même des tissus (Schwarzerová et al., 2003; Pokorna et al., 2004).

## **β. Le calcium comme second messenger**

Chez les plantes, les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) constituent un second messenger, faisant le lien entre les réponses physiologiques de la plante et les signaux externes reçus (Reddy and Reddy, 2004). Les modifications de concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres dans le cytosol sont visibles au cours de la transduction des stimuli abiotiques incluant, la lumière, les basses et hautes températures, le toucher, les stress hyper-osmotique et oxydatif, mais également dans le cas des stimuli biotiques incluant les éliciteurs fongiques et les facteurs de nodulation (Rudd and Franklin-Tong, 2001; Sanders et al., 2002). Le stimulus induit une augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol et aide ainsi à définir la réponse (Klimecka and Muszynska, 2007). Tout processus cellulaire médié par le calcium commence donc par cette augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme (ou le noyau) via une synchronisation des activités des canaux, pompes et transporteurs. L'augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques est principalement due à un influx de calcium venant de l'extérieur des cellules (Monroy and Dhindsa, 1995; Knight et al., 1996) mais aussi à un relargage venant de la vacuole par l'inositol (1,4,5) triphosphate et l'ADP-ribose cyclique (Knight et al., 1996; Nisi and Zocchi, 1996; Veena et al., 2001; Xiong et al., 2001). L'influx de calcium venant du milieu extracellulaire et le relargage des réserves intracellulaires sont des processus nécessitant de l'énergie et qui interviennent à l'ouverture des canaux calciques. Ces changements de niveau dans la concentration du calcium cytoplasmique sont détectés par un groupe de protéines spécifiques, qui sont des détecteurs de calcium.

Dans le cas du stress froid, l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  est une réponse à la fois à un choc thermique froid (Knight et al., 1991; Knight et al., 1996) et à une baisse graduelle de la température (Plieth et al., 1999; Nordin Henriksson and Trewavas, 2003). L'exposition au froid se traduit par une réponse biphasique du  $\text{Ca}^{2+}$  (Knight et al., 1996; Kiegle et al., 2000), la première augmentation de concentration étant toujours plus élevée que la seconde (Plieth et al., 1999; Knight and Knight, 2000). Mais, plus le refroidissement est lent, plus le second pic augmente.

Les modifications de concentration de calcium induites par l'abaissement de la température sont corrélées avec l'expression des gènes de réponse au froid et le développement de la tolérance au gel. En effet, chez la luzerne le traitement des cellules avec des chélateurs de  $\text{Ca}^{2+}$  ou des produits bloquant les canaux calciques empêche aussi bien l'influx de calcium que l'expression du gène de réponse au froid *COLD ACCLIMATION SPECIFIC 15 (CAS15)* et le développement de la tolérance au gel (Monroy et al., 1993b;

Monroy and Dhindsa, 1995; Veena et al., 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, les produits bloquant les canaux calciques et les chélateurs de  $Ca^{2+}$  inhibent l'activation sous l'effet du froid des gènes *LOW TEMPERATURE INDUCED 78* (LTI78, Nordin Henriksson and Trewavas, 2003) et *COLD INDUCED 1 & 2* (KIN 1 & 2, Knight et al., 1996; Tahtiharju et al., 1997).

La traduction du signal calcique en expression de gènes spécifiques de réponse au froid passe par une cascade d'activation de protéines spécifiques comme les kinases (Encadré 3).

### Encadré 3 : Les décodeurs du signal calcique au cours de l'acclimatation au froid

Tout signal calcique induit par le froid est reconnu par des protéines de liaison au  $Ca^{2+}$  qui possèdent généralement un motif EF-hand qui est un domaine de structure hélice-boucle-hélice constitué de deux hélices alpha positionnées de façon perpendiculaire et reliées par une petite boucle à laquelle se fixe le calcium (Snedden and Fromm, 2001). Il existe 3 classes majeures de protéines EF-hand caractérisées chez les plantes : la classe des calmodulines et calmodulines-like (CaM), la classe des calcineurine B-like (CBL) et la classe des protéines kinases dépendant du calcium (CDPK, Rudd and Franklin-Tong, 2001; Snedden and Fromm, 2001; Luan et al., 2002; Sanders et al., 2002; Hrabak et al., 2003). Une quatrième classe de protéines est supposée jouer un rôle dans la signalisation du calcium à cause de la grande capacité de ses protéines à se lier au  $Ca^{2+}$  : ce sont les calréticulines (CRT, Persson et al., 2001; Persson et al., 2003).

- Les CaM ne possèdent pas d'activité catalytique propre mais après une liaison au calcium, elles activent de nombreuses protéines cibles impliquées dans divers processus cellulaires (Snedden and Fromm, 1998, 2001). Dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana* et du tabac, les stimuli environnementaux comme le froid déclenchent une transcription rapide des gènes codant les protéines CaM et CaM-like (Braam, 1992; Luit et al., 1999). Une particularité de ces protéines est qu'elles possèdent à la fois un effet positif et négatif sur l'acclimatation au froid, dépendant probablement de l'équilibre entre le calcium, les CaM elles-mêmes ainsi que leurs protéines cibles.
- Les CBL ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Liu and Zhu, 1998; Kudla et al., 1999; Luan et al., 2002; Kolukisaoglu et al., 2004). Les analyses de mutants perte de fonction et de lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant le gène *AtCBL1* ont démontré le rôle important de la protéine codée dans les réponses aux stress abiotiques (Albrecht et al., 2003). Les protéines AtCBL interagissent spécifiquement avec un groupe de sérine-thréonine protéines kinases appelées CBL-Interacting Protein Kinases (CIPK)



ou SOS2-like protein kinase (Kim et al., 2000; Gong et al., 2004) et qui sont codées par une famille multigénique chez *Arabidopsis thaliana*. L'un des membres de cette famille, *CIPK3* est induit par des stress comme le froid, la sécheresse, la salinité, mais aussi par l'ABA.

- Les CDPK : ce sont des sérine/thréonine protéines kinases dont le domaine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  est directement rattaché au domaine kinase ; chez les plantes elles représentent un groupe de détecteurs de calcium large et différencié impliqués dans les stress abiotiques notamment le froid (Harmon et al., 2000; Cheng et al., 2002; Ludwig et al., 2004). La famille des protéines kinases CDPK/SnRK a été définie grâce à une analyse de similitude de séquence de 1264 séquences de protéines kinases de plantes (Hrabak et al., 2003). Tous les membres de cette superfamille ont une organisation générale similaire. Cinq sous-familles sont connues comme étant directement régulées par le calcium. Chez la luzerne, Monroy et Dhindsa (1995) ont mis en évidence une expression différentielle de deux *CDPK* sous l'effet froid. Chez le riz, le gène codant la *CDPK7* est induit par les stress froid et salin (Saijo et al., 2000).

Outre les protéines EF-hand, on distingue aussi les mitogen-activated protein kinases (MAPK) qui sont des sérine/thréonine protéines kinases jouant un rôle clé par l'intégration de plusieurs signaux transmis par des seconds messagers variés (exemple :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Leur cascade d'activation est composée de trois protéines kinases : les MAPKKK sont activées par un signal messenger induit par un stress et elles activent ensuite les MAPKK par une phosphorylation au niveau des acides aminés conservés sérine/thréonine ; une fois activées, les MAPKK activent à leur tour les MAPK en les phosphorylant au niveau des résidus thréonine et tyrosine dans les motifs TXY (Thr-x-Tyr, où x représente un acide aminé quelconque). Les MAPK sont impliquées dans la transduction du signal au cours des réponses aux stress environnementaux (salin, froid, osmotique, blessures, etc.) des eucaryotes (Mizoguchi et al., 1997; Nakagami et al., 2005). Chez les plantes, plusieurs MAPK ont été clonées, elles sont impliquées dans les réponses aux stress environnementaux dont le froid. Chez la luzerne (Jonak et al., 1996; Sangwan et al., 2002) et *Arabidopsis thaliana* (Ichimura et al., 2000) par exemple, il a été montré que l'activité MAPK augmente avec le stress froid.

## **b. Les modifications subies par les membranes cellulaires sous l'effet des basses températures**

Sous l'effet du froid, des modifications apparaissent dans les membranes de la cellule (essentiellement la membrane plasmique, mais aussi les endomembranes comme celles des chloroplastes, des mitochondries ou du réticulum endoplasmique). On observe notamment une modification du pool enzymatique entraînant une suractivité des désaturases (Cheesbrough, 1989; Williams et al., 1992), une modification des rapports entre lipides et protéines et une modification dans la composition lipidique (Bohn et al., 2007).

Le changement le plus marquant dans le cas de la membrane plasmique (en première ligne avec la paroi dans la perception du froid) est l'augmentation de la proportion des phospholipides. Ce changement a été observé chez plusieurs espèces monocotylédones comme dicotylédones et chez les espèces herbacées comme ligneuses (Uemura and Yoshida, 1984; Yoshida and Uemura, 1984; Uemura and Steponkus, 1994; Uemura et al., 1995). Cette augmentation intervient pendant les premières étapes de l'acclimatation au froid et est principalement due à l'accroissement de la proportion des espèces di-insaturées de phosphatidylcholine et de phosphatidylethanolamine. On observe également une diminution des cérébrosides ainsi qu'une augmentation du ratio stérols libres/glycolipides, progressivement au cours de l'acclimatation au froid (Bohn et al., 2007). Ainsi l'insaturation des acides gras de la membrane est un caractère important dans la capacité de tolérance au gel. Cette augmentation de la proportion des acides gras insaturés permet de maintenir une fluidité membranaire fonctionnelle à basse température et d'abaisser la température de transition de phase des lipides en vue de préserver l'intégrité de la cellule (Falcone et al., 2004; Martz et al., 2006).

Le maintien de la fluidité membranaire est déterminant sous plusieurs aspects. Dans le cadre de la photosynthèse par exemple, plusieurs réactions importantes de la chaîne photosynthétique ont lieu dans la membrane des thylakoïdes. La préservation de l'intégrité de cette membrane est donc un paramètre déterminant pour la cellule. Chez *Arabidopsis thaliana* il a été montré que le bon fonctionnement de la photosynthèse dans des conditions de froid prolongé dépend fortement de la teneur en acides gras triénoïques (comportant trois insaturations, Routaboul et al., 2000). Chez les végétaux supérieurs comme le pois, les membranes chloroplastiques sont majoritairement composées de glycérolipides (essentiellement des galactolipides et des sulfolipides) tels que le

MonoGalactosylDiacylGlycérol (MGDG), le DiGalactosylDiacylGlycérol (DGDG) et le SulfoQuinovosylDiacylGlycérol (SQDG). Dans les membranes des thylakoïdes, le froid provoque une baisse du rapport MGDG/DGDG, ce qui a une répercussion sur la stabilité et le fonctionnement de ces membranes (Marja-Liisa, 2007). Certains autres constituants lipidiques sont présents en faible quantité dans les membranes mais jouent un rôle important dans les propriétés physiques de celles-ci. C'est le cas par exemple du phosphatidylglycérol (PG, 5 à 15% des lipides chloroplastiques) qui, lorsqu'il est combiné à des acides gras saturés, réduit la fluidité membranaire et donc augmente la sensibilité au froid (Murata et al., 1992). En fait, le PG est crucial pour le transport des électrons à travers la chaîne photosynthétique, le développement des chloroplastes et la tolérance aux basses températures (Zhu et al., 2008). Chez le tabac, il a été montré que les variétés les plus tolérantes à la photoinhibition à basse température sont celles qui possèdent les plus faibles proportions d'espèces moléculaires saturées de PG (Moon et al., 1995). Une grande proportion en espèces moléculaires saturées de PG réduirait la stabilité de la protéine D1 du PSII à basse température (Zhu et al., 2008).

Outre le rôle important joué par l'insaturation des acides gras des lipides membranaires, les rapports lipides/protéines aussi sont déterminants dans la tolérance au gel. Chez le seigle d'hiver (*Secale cereale* L.) par exemple, au cours de l'acclimatation au froid, le ratio phospholipides/protéines augmente et on observe des différences significatives dans la composition des polypeptides et des glycopeptides entre les membranes acclimatées et non acclimatées (Uemura and Yoshida, 1984).

### **c. L'acclimatation au froid et la photosynthèse**

L'acclimatation au froid est un processus dynamique, dépendant de l'activité photosynthétique (Griffith and McLntyre, 1993; Wanner and Junttila, 1999). Un des aspects les plus importants d'une acclimatation au froid réussie est la capacité d'ajustement de l'appareil photosynthétique pour un fonctionnement à basse température, surtout dans des conditions d'éclairement moyen à intense qui pourraient exposer la plante à la photoinhibition (Osmond, 1994). En causant un déséquilibre entre l'énergie photochimique d'une part et le transport d'électrons à travers les photosystèmes et les voies métaboliques d'autre part, les basses températures perturbent le cycle normal des réactions photosynthétiques. Puisque le but principal de la photosynthèse est de maximiser l'utilisation du carbone et des ressources en azote et de minimiser les dommages engendrés par l'excès d'énergie absorbée (Huner et

al., 1998; Paul and Foyer, 2001), les plantes ont mis en place des rétrocontrôles pour maintenir le bon équilibre (Encadré 1 : Fig.c ; Figure II-4). Ainsi, émission de fluorescence et libération de chaleur sont des mécanismes de sécurité mis en place par les plantes pour évacuer l'énergie lumineuse excédentaire. Elles participent à la protection des chloroplastes contre la photoinhibition, mais elles réduisent par contre l'efficacité de la photosynthèse.

Des variables physiologiques sont souvent utilisées pour sélectionner les génotypes ayant une meilleure tolérance aux basses températures. Une de ces variables permet d'évaluer l'état de l'appareil photosynthétique en mesurant la fluorescence émise par la chlorophylle a (Klosson and Krause, 1981; Strand and Öquist, 1988; Krause and Weis, 1991; Maxwell and Johnson, 2000). Elle fournit une estimation des changements relatifs du niveau d'excitation du PSII (Adams et al., 1995). C'est une méthode non destructive et simple. Cette mesure du ratio de la fluorescence chlorophyllienne ( $F_V/F_M$ , Encadré 4) est ainsi considérée comme un bon indicateur quantitatif du rendement potentiel quantique du PSII et est utilisée pour la mesure des dommages de stress (Björkman and Demmig, 1987; Somersalo and Krause, 1990; Jiang et al., 1999). En présence de photoinhibition,  $F_V/F_M$  baisse et cette baisse est attribuée à une perte d'activité de la protéine D1.

#### Encadré 4 : Mesure $F_V/F_M$ de la fluorescence chlorophyllienne

Un des paramètres les plus utilisés pour la fluorescence est le ratio  $F_V/F_M$ . Les feuilles maintenues à l'obscurité (en général pour environ 20 minutes) évacuent l'énergie résiduelle et le niveau de fluorescence mesuré est faible et est minimal ( $F_0$ ). Si on envoie sur les feuilles un flash lumineux intense, la capacité d'utilisation de l'appareil photosynthétique est surpassée et la fluorescence émise augmente à un niveau maximal ( $F_M$ ). La différence entre le niveau maximale et le niveau minimale constitue la fluorescence variable ( $F_V$ ).

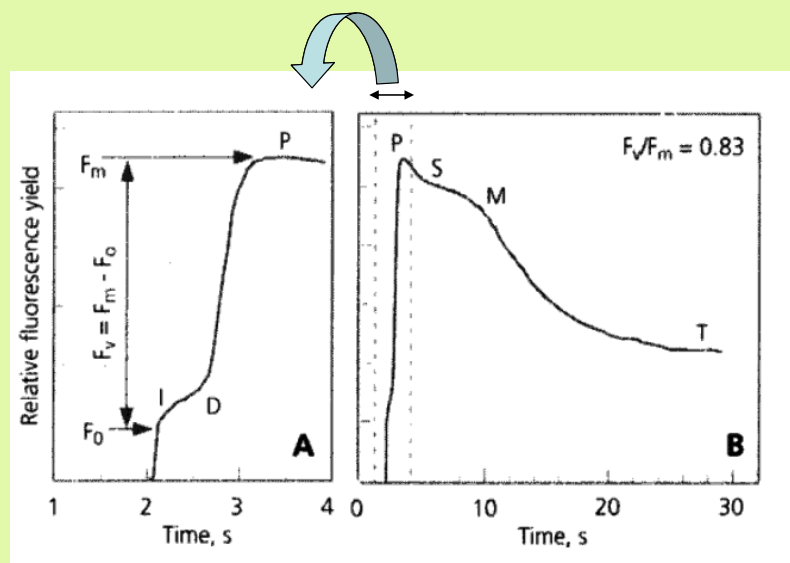


Figure : Courbe de Kautsky (Kautsky and Hirsch, 1931) montrant le niveau de rendement relatif de la fluorescence. La phase ascendante reflète les propriétés d'antenne et de centre de réactions du PSII et la phase descendante traduit l'induction de la photosynthèse (cycle de Calvin et mécanismes non photochimiques actifs dans les antennes) qui réduit le niveau de fluorescence. D'après (Rosenqvist and van Kooten, 2003).

La valeur moyenne de  $F_V/F_M$  pour des plantes en bonne santé est d'environ 0,84 (Björkman and Demmig, 1987) et toute baisse de ce ratio est proportionnelle aux dommages dus au stress (photoinhibition).

Les plantes ont développé différentes méthodes de réponse aux changements que subissent leurs milieux de vie. Ces méthodes vont des ajustements dans le fonctionnement des protéines de l'appareil photosynthétique, dans des délais de quelques secondes à quelques heures (Demmig-Adams and Adams, 1992), aux processus de développement de long terme au niveau de la plante entière ou des feuilles (exemple : modification des ratios partie aérienne/partie racinaire, modification de l'anatomie foliaire, etc) et qui se mettent en place sur des périodes de quelques semaines à quelques mois (Ballare, 1999; Weston et al., 2000). Entre ces deux extrêmes, on distingue un autre niveau de réponse qui implique des réajustements dans la composition de l'appareil photosynthétique au sein des cellules (Walters, 2005), un processus connu sous le nom d'**acclimatation photosynthétique**. Les plantes peuvent ainsi développer des mécanismes de régulation permettant une meilleure adéquation entre photosynthèse et basses températures. Ces réponses dynamiques impliquent un grand nombre de stratégies pour ajuster la capacité des puits et des sources métaboliques de la plante. Les stratégies varient en fonction des espèces et des génotypes (Gray et al., 1996; Walters, 2005; Ensminger et al., 2006). Collectivement, ces réponses dynamiques d'acclimatation impliquent la dissipation de l'excès d'énergie absorbée sous forme de chaleur, des changements dans la stoechiométrie de la machinerie photosynthétique, l'activation du système d'enzymes antioxydantes, la dégradation et la réparation des polypeptides endommagés, des changements quantitatifs dans les complexes protéiques impliqués dans les réactions de fixation du carbone, ainsi que divers processus de régulation (Walters, 2005; Ensminger et al., 2006). A basse température, les caroténoïdes (autres pigments photosynthétiques) par exemple, sont capables d'accepter l'énergie d'excitation de la chlorophylle à l'état de triplet (dangereux) et d'empêcher la formation de l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , protégeant ainsi l'appareil photosynthétique. Par ailleurs, des études récentes ont montré que les xanthophylles via la zéaxanthine sont impliquées dans la dissipation thermique de l'excès d'énergie (Laisk and Oja, 2000; Muller et al., 2001). En effet, lorsque la plante est exposée à une forte luminosité continue, l'excès d'excitation du PSII génère un haut gradient de pH à travers la membrane des thylakoïdes et active au sein du cycle des xanthophylles l'interconversion qui augmente la zéaxanthine au détriment de la violaxanthine.

Il a été montré que lorsque la plante réussit son acclimatation au froid, on observe une récupération des capacités d'enzymes clés comme la Rubisco et la saccharose phosphate synthase (SPS, Holaday et al., 1992; Hurry et al., 1994). Il en résulte une augmentation progressive de la photosynthèse par rapport au début du stress (Berry and Bjorkman, 1980; Hjelm and Ogren, 2003).

Toutes les plantes originaires de régions froides ne sont pas capables d'acclimater leurs feuilles matures (développées dans des conditions de températures optimales) lorsque la température baisse. La plupart des espèces d'arbre en sont capables (Berry and Bjorkman, 1980), alors que beaucoup d'espèces herbacées en sont incapables (Huner et al., 1993). Ces dernières peuvent très bien acclimater leurs nouvelles feuilles développées à basse température, mais une acclimatation complète ne peut avoir lieu que lorsque toutes les vieilles feuilles seront remplacées (Hjelm and Ogren, 2003).

A basse température, les plantes présentent des différences dans leur capacité à acclimater leur appareil photosynthétique :

- dans les zones tempérées, la plupart des arbres à feuilles persistantes maintiennent leurs feuilles pendant l'hiver, en l'absence de toute croissance. Ceci grâce à une capacité durable de dissipation de l'excès de lumière subi à basse température, sous forme de chaleur via les mécanismes de quenching non photochimique (Figure II-4 ; Adams et al., 1995). Certains conifères comme *Pinus banksiana* se teintent d'une couleur violacée par accumulation des anthocyanes dans les cellules épidermiques. Ceci découle d'une interaction complexe entre la photopériode, les basses températures et la luminosité (Krol et al., 1995). L'accumulation des anthocyanes leur permettrait de protéger leurs aiguilles contre la photoinhibition du PSII lorsqu'ils sont exposés à la lumière et aux basses températures, afin de réduire le flux photonique absorbé. Les anthocyanes constitueraient donc un écran solaire naturel à la fois contre les rayons UV-B et les fortes intensités lumineuses (Gould et al., 1995; Huner et al., 1998; Hurry et al., 1998).
- Chez les céréales, à la différence des plantes à feuilles persistantes, le seigle et le blé d'hiver par exemple, maintiennent une photosynthèse active à basse température positive par une tolérance accrue à la photoinhibition (Somersalo and Krause, 1989; Huner et al., 1993). Ceci est obtenu grâce à des changements de viscosité membranaire des thylakoïdes. Ces espèces sont ainsi capables de maintenir la quinone  $Q_A$  oxydée grâce à une capacité photosynthétique élevée (Huner et al., 1993; Oquist et al., 1993; Huner et al., 1998). Cette capacité de maintien de la quinone  $Q_A$  oxydée serait la conséquence d'une augmentation, sous l'effet du froid, des ARNm et du niveau protéique des principales enzymes du métabolisme photosynthétique que sont la Rubisco, la fructose biphosphate et la saccharose phosphate synthase (Huner et al., 1998; Hurry et al., 1998), d'où un

niveau relativement élevé de croissance dans des conditions potentiellement photoinhibitrices.

En bref, les herbacées annuelles d'hiver mettent à profit les mois d'automne pour se préparer intensément en augmentant le métabolisme photosynthétique du carbone et en coordonnant les changements dans le métabolisme respiratoire, au risque donc de subir des dégâts s'il y a des coups de gel subits. A l'inverse, les arbres à feuilles persistantes diminuent fortement leur photosynthèse et privilégient la mise en place des systèmes de photo-protection pour survivre aux hivers rigoureux (Bauer et al., 1994; Savitch et al., 2002). On peut relier ces comportements au fait que les conifères ont besoin de conserver leurs épines pendant des années, alors les feuilles des espèces d'hiver comme le blé et le seigle meurent au printemps qui suit, faisant place à de nouvelles feuilles. L'énergie initiale pour la croissance des nouvelles feuilles provient des réserves accumulées précédemment dans les tissus du collet (Ensminger et al., 2006). Chez les dicotylédones (Guy et al., 1992; Hurry et al., 1995; Strand et al., 2003) comme chez les monocotylédones (Hurry et al., 1994; Savitch et al., 1997), il a été montré que le rétablissement de la capacité photosynthétique à basse température dépend fortement de l'induction de la voie de biosynthèse du saccharose. Cette biosynthèse, ajoutée à l'acclimatation photosynthétique est importante pour fournir l'énergie nécessaire à d'autres mécanismes critiques de la tolérance au gel comme la synthèse de protéines spécifiques de la tolérance au stress, le renouvellement des lipides, ainsi que la fourniture de sucres cryoprotecteurs ou osmotiquement actifs (Strand et al., 2003).

### **3. La régulation des gènes de réponse au froid**

Les gènes induits au cours du stress froid peuvent être classés en deux catégories en tenant compte des fonctions de leurs produits (Bohnert et al., 2001; Seki et al., 2001; Zhu et al., 2001) : le groupe 1 comprend les gènes codant des enzymes ou des composants structuraux qui participent directement à la protection des cellules contre les dommages dus au gel et le groupe 2 est constitué des facteurs de transcription et autres protéines de régulation (cf. Tableau II-2).



Tableau II-2 : Récapitulatif des gènes impliqués dans la réponse au froid, classés en deux groupes (adapté de Agarwal et al., 2006)

<b>Groupe 1 = Gènes effecteurs</b>	<b>Groupe 2 = Gènes régulateurs</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ protéines fonctionnelles ex : protéines membranaires qui maintiennent les mouvements hydriques au travers des membranes (canaux hydriques et transporteurs membranaires)</li> <li>✓ enzymes clé de biosynthèse des osmolytes (proline, bétaïne, sucres, etc.)</li> <li>✓ enzymes de détoxification qui permettent aux métabolismes, cellulaire, physiologique ou biochimique de se maintenir à un niveau normal (glutathion S-transférase (GST), hydrolase, catalase, superoxyde dismutase, désaturas, etc.)</li> <li>✓ protéines de protection des macromolécules (protéines LEA comme les déhydrines, osmotine, protéines antifreeze, chaperonnes, protéines de liaison à l'ARNm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ protéines de régulation comme les facteurs de transcription (bZIP, MYC, MYB, DREB, etc.)</li> <li>✓ protéines kinases (MAPK, CDPK, protéine kinase réceptrice, protéine kinase ribosomale, protéine kinase de régulation de la transcription, etc.)</li> <li>✓ protéinases impliquées dans la régulation de la transduction du signal et l'expression des gènes (phosphoestérases et phospholipase C, etc.)</li> </ul>

Sous l'effet du froid, des centaines de gènes sont induits ou réprimés. Plusieurs de ces gènes sont aussi régulés par les stress hydrique et salin ou l'ABA, ce qui implique qu'un certain nombre de voies de transduction du signal déclenchées au cours de ces stress leur sont communes (Thomashow, 1999; Kreps et al., 2002; Seki et al., 2002; Shinozaki et al., 2003).

L'acclimatation au froid implique une régulation précise de facteurs de transcription (FT) et de gènes effecteurs, collectivement appelés gènes « *Cold-Regulated* » (COR, Thomashow, 1999; Viswanathan and Zhu, 2002). Des progrès importants ont été accomplis dans l'identification des régulateurs (transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels) de l'expression des gènes *COR* (Chinnusamy et al., 2006). Les promoteurs de ces gènes possèdent la plupart du temps, des éléments cis-régulateurs comme les éléments de réponse à la déshydratation (e.g. *Dehydration-Responsive Elements/C-Repeat Elements DRE/CRT*, aussi connus sous le nom de *LTRE, Low-Temperature-Responsive Element*), des éléments de réponse à l'ABA (*ABA Response Element ABRE*), et des séquences de myéloblastose (*MYB*) et/ou de reconnaissance de la myélocytomatose (*MYC*). L'expression

des gènes *COR* est régulée par deux voies différentes mais liées (Narusaka et al., 2003) : les voies dépendante et indépendante de l'ABA (Figure II-9).

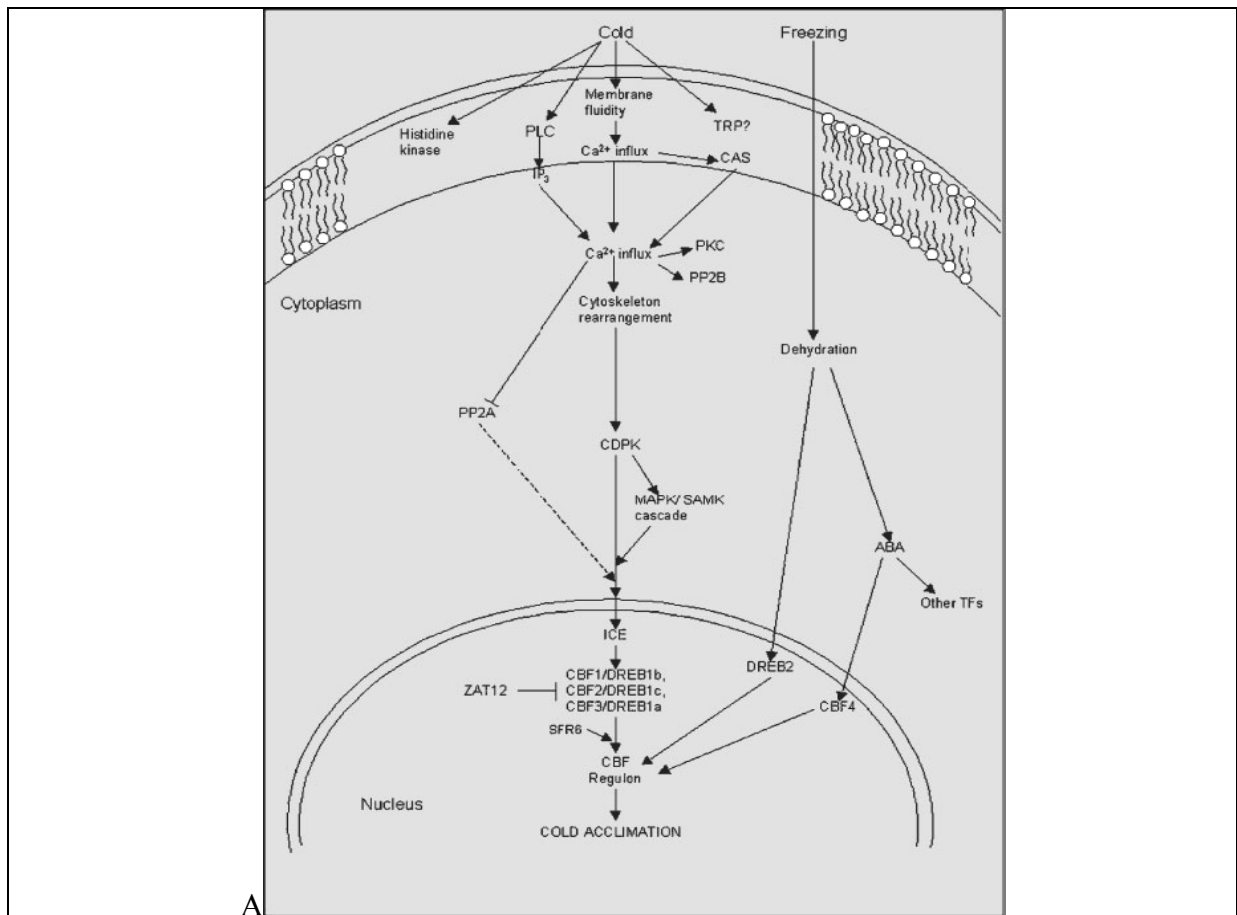
#### **a. La voie de signalisation indépendante de l'ABA**

Après l'identification des gènes *COR*, l'étape importante suivante fut la découverte chez *Arabidopsis thaliana* des facteurs de transcription *C-repeat Binding Factor* (CBF, Stockinger et al., 1997; Gilmour et al., 1998) ou *Dehydration-Responsive Element Binding factors 1* (DREB1, Qiang et al., 1998; Shinwari et al., 1998). Les FT codent des protéines qui se lient à l'ADN (ou à d'autres protéines) et qui interagissent avec d'autres régulateurs de la transcription pour recruter ou bloquer l'accès des ARN polymérases à la matrice de l'ADN (Lee and Young, 2000). Ils sont donc capables d'activer ou de réprimer la transcription de nombreux gènes. Les facteurs de transcription *CBF* contrôlent l'expression des gènes *COR* via une voie indépendante de l'ABA, exception faite du *CBF4* impliqué dans la voie de signalisation dépendante de l'ABA (Haake et al., 2002). Ces FT appartiennent à la famille des protéines de liaison à l'éthylène (Ethylene-Responsive Element Binding Protein/APETALA2, EREBP/AP2 ; Stockinger et al., 1997; Qiang et al., 1998) et se lient aux domaines *DRE* ou *CRT* des gènes *COR* (Figure II-10). Ces éléments *CRT/DRE* possèdent un domaine conservé (CCGAC) qui est suffisant pour induire la transcription sous l'effet du froid. Les gènes *CBF/DREB1* sont transitoirement induits par le froid (dès 15 minutes d'exposition) et leur expression précède celle des gènes de réponse au froid *CRT/DRE* (Gilmour et al., 1998; Medina et al., 1999). La caractérisation de ces gènes s'est faite essentiellement chez *Arabidopsis thaliana*, mais certains travaux ont également été effectués chez d'autres espèces.

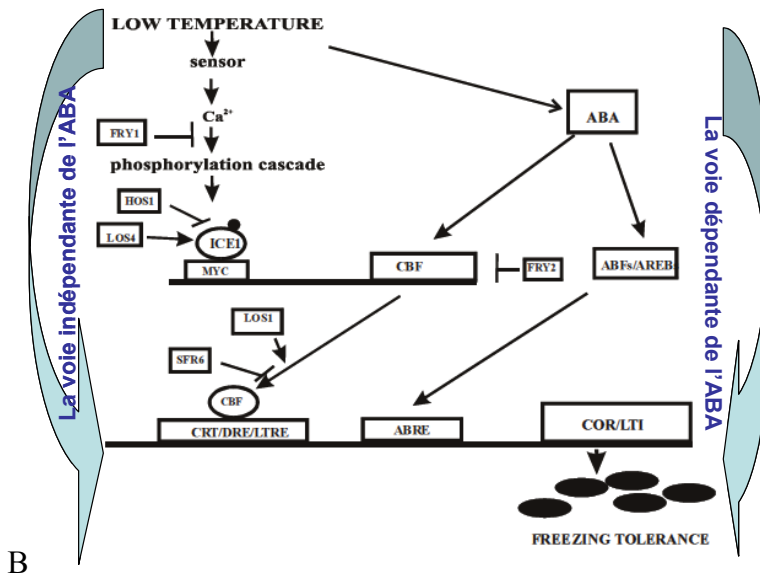
#### **α. Les découvertes chez *Arabidopsis thaliana***

Chez *Arabidopsis thaliana*, trois gènes *CBF/DREB1* (*CBF1/DREB1B*, *CBF2/DREB1C* et *CBF3/DREB1A*) ont été identifiés (Thomashow et al., 2001). L'expression de *CBF1/DREB1B* et de *CBF3/DREB1A* précède celle de *CBF2/DREB1C* (Novillo et al., 2004). Par ailleurs, outre son induction des gènes *COR*, *CBF2* agirait comme un régulateur négatif de *CBF1* et *CBF3* pour assurer leur expression transitoire (Novillo et al., 2004). De plus, l'expression des gènes *CBF* dans leur ensemble peut être réprimée par les produits de leurs gènes cibles en aval, ce qui assure une régulation de l'expression (Guo et al., 2002;

Chinnusamy et al., 2003). La surexpression constitutive (en l'absence de stimulus comme le froid) ou stress dépendante des gènes *CBF1* ou *CBF3* dans des plantes transgéniques entraîne une expression constitutive ou renforcée des gènes *COR* et une augmentation de la tolérance aux stress abiotiques y compris la tolérance au gel chez *Arabidopsis thaliana* (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Gilmour et al., 2004). Plusieurs facteurs et composants impliqués dans le contrôle de l'expression des *CBF* ont été caractérisés (Ishitani et al., 1997). Puisque les transcrits de *CBF* s'accumulent déjà dès 15 minutes après exposition des plantes au froid, Gilmour et al. (1998) ont émis l'hypothèse de l'existence d'un ou plusieurs FT, déjà présents dans les cellules dans les conditions normales de croissance, et qui reconnaîtraient les promoteurs des *CBF* pour induire leur expression rapide sous l'effet du froid. Il s'agit de protéines « Inducer of CBF Expression » (ICE), comme par exemple ICE1 caractérisée par Chinnusamy et al. (2003). Le gène *ICE1* code pour un activateur de transcription MYC-like helix-loop-helix qui se lie aux séquences de reconnaissance des MYC situées dans les promoteurs des *CBF* (Figure II-9B). Certains éléments sont des régulateurs négatifs de la transduction du signal froid. C'est le cas par exemple des *High expression of Osmotically responsive genes 1 & 2* (HOS1 & HOS2, Lee et al., 1999; Lee et al., 2001). Ce sont des ubiquitines ligases à domaine RING (Really Interesting New Gene) finger, qui induisent une dégradation de la protéine ICE1, et ainsi inhibent l'expression des *CBF* et partant de leurs gènes cibles en aval.



A



B

Figure II-9 : Voies de signalisation induites par le froid chez les végétaux.

- A) Vue d'ensemble des scénarios de transduction du signal froid menant à l'acclimation au froid (Pragya et al., 2005)
- B) Voies d'induction des gènes de réponse au froid dépendante et indépendante de l'ABA (Puhakainen, 2004)

## **β. Quelques travaux chez d'autres espèces végétales**

Le rôle des *CBF* a été confirmé chez d'autres espèces en dehors d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi, la surexpression des gènes *CBF1/3* d'*Arabidopsis thaliana* augmente la tolérance aux stress froid, gel, hydrique et/ou salin chez le colza (Jaglo et al., 2001), la tomate (Hsieh et al., 2002), le tabac (Kasuga et al., 2004), le blé (Pellegrineschi et al., 2004) ou le riz (Oh et al., 2005). Par ailleurs, des orthologues de *CBF/DREB1* ont été trouvés chez d'autres espèces. En effet, de la même façon, la surexpression chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* d'orthologues du gène *DREB1* de riz (Dubouzet et al., 2003) ou du maïs (Qin et al., 2004) est suffisante pour induire une expression constitutive de gènes *COR* et conférer une tolérance au gel ou à la sécheresse.

Il ressort de ces découvertes que la signalisation des *CBF* est très conservée chez les plantes. En plus, il a également été montré que la présence de *CBF* n'est pas limitée aux seules plantes capables de s'acclimater au froid, car la tomate, plante sensible au froid, possède des transcrits de *CBF*, bien que la voie de transduction du signal *CBF* soit non fonctionnelle (Jaglo et al., 2001).

### **b. La voie de signalisation dépendante de l'ABA**

L'acide abscissique (ABA) peut activer plusieurs gènes associés au froid, à la sécheresse, à la salinité, aux lésions thermiques, à la dessiccation, au stockage des protéines, à la dormance, à la germination, à l'arrêt du développement embryonnaire et à la fermeture des stomates (Giraudat et al., 1994; Busk and Pages, 1998; Gusta et al., 2005). L'ABA est ainsi impliqué dans l'acclimatation au froid chez les plantes. Sous l'effet du froid, sa concentration augmente transitoirement à la fois chez les espèces herbacées et chez les espèces ligneuses (Chen and Gusta, 1983; Lang et al., 1994; Gusta et al., 2005; Jehan et al., 2006). L'application d'ABA exogène à une température normale de croissance, induit une augmentation de la tolérance au gel, une synthèse *de novo* de protéines, mais aussi l'induction de divers gènes de réponse au froid (Chen and Gusta, 1983; Li et al., 2003a).

Les gènes de réponse au froid induits par l'ABA exogène possèdent des domaines *ABA Response Element (ABRE, ACGTGG/TC)*. Les protéines de liaisons aux sites *ABRE*, appelées AREB (ABRE binding protein) ou ABF (ABRE binding factor), appartiennent à la classe des facteurs de transcription bZIP (basic leucine zipper). Elles se lient au domaine

*ABRE* pour activer l'expression des gènes ABA dépendants (Figure II-9, Choi et al., 2000; Uno et al., 2000). Les gènes codant les AREB sont eux-mêmes induits par l'ABA et sont différenciellement régulés par les stress environnementaux.

Plusieurs études ont montré que le niveau de tolérance au gel induit par l'ABA est toujours inférieur à celui induit par le froid. Par exemple, Churchill et al. (1994) ont montré que chez le seigle, cultivar « Puma », on observe une augmentation de la tolérance au gel jusqu'à -9°C par un arrosage racinaire avec 100µM d'ABA ; or cette espèce peut avoir un niveau de tolérance avoisinant -30°C lorsqu'elle est complètement acclimatée par le froid. Ce sont de telles observations qui ont d'ailleurs suggéré l'existence de la voie de signalisation indépendante de l'ABA.

Par ailleurs, les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de l'ABA interagissent entre elles ; en effet, plusieurs gènes induits par les stress osmotique et froid possèdent à la fois les éléments *DRE/CRT* et *ABRE* au niveau de leurs promoteurs. C'est le cas par exemple du gène *Responsive to Dehydration 29A (RD29A)* d'*Arabidopsis thaliana* qui code une protéine LEA (Late Embryobeneses Abundant)-like qui contient à la fois le motif ABRE et le motif DRE/CRT (Figure II-10).

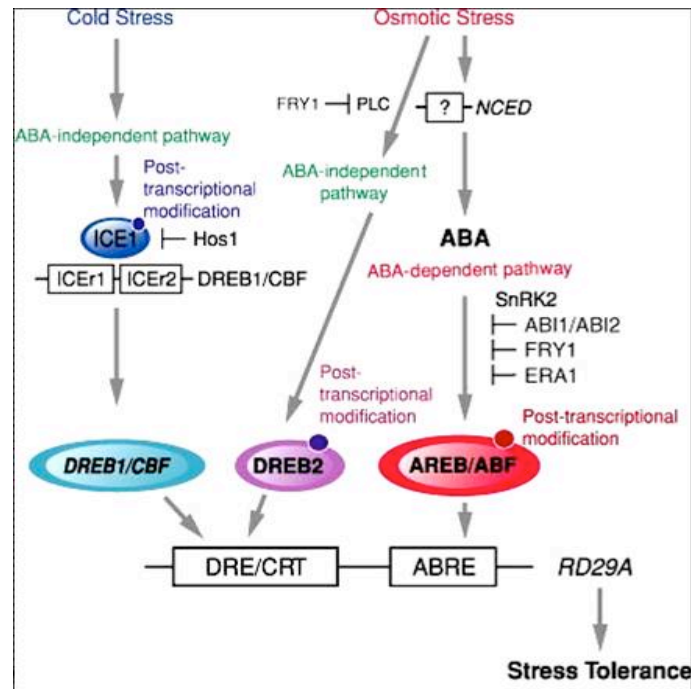


Figure II-10 : Exemple d'interaction entre les voies dépendante et indépendantes de l'ABA : induction du gène *RD29A* d'*Arabidopsis thaliana*.

D'après Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (2006)

### c. Le fonctionnement des gènes *COR* : exemple des déhydrines (DHN)

Au bout de la cascade de réactions depuis la détection du signal froid en passant par le calcium et les facteurs de transcription, il y a l'activation d'une série de gènes effecteurs dont la nature dépend des espèces. Après avoir vu comment les facteurs de transcription comme les *CBF* agissent, Il serait intéressant de décrire les effets ultimes de ces gènes qui vont agir pour la protection des cellules contre les dommages dus au gel. Les déhydrines sont un exemple de ces gènes.

Les protéines déhydrines appartiennent à la famille des « Late Embryogenesis Abundant (LEA) D11 » (Ingram and Bartels, 1996). Elles sont hautement hydrophiles, solubles dans l'eau bouillante et riches en glycine et en acides aminés polaires (Kosova et al., 2007). Elles sont synthétisées chez les plantes en réponse à différents stimuli environnementaux qui induisent la déshydratation, comme le froid ou la chaleur, les stress salin et hydrique, et dans les étapes de développement comme la maturation du pollen ou des graines (Close, 1996, 1997; Wisniewski et al., 2006; Wahid and Close, 2007). L'expression des gènes codant ces protéines peut également être induite par une augmentation de la teneur en ABA (Kosova et al., 2007).

Les *DHN* sont caractérisées par trois domaines hautement conservés : les segments K, Y et S. Le segment K (EKKGIMDKIKEKLPG) présent en une ou plusieurs copies, est le seul domaine conservé chez toutes les *DHN*. Le segment Y (DEYGNP) se présente souvent en 1 à 3 copies, proches de l'extrémité N-terminal des *DHN*. Le segment S se compose d'une série de résidus sérine suivis de trois résidus acides, permettant une phosphorylation par la caséine kinase II (CKII, Close, 1997), et participant ainsi au ciblage nucléaire des *DHN* (Jensen et al., 1998).

Les *DHN* se localisent à la fois dans le noyau, le cytoplasme, les mitochondries, la vacuole, les membranes plasmiques et dans l'apoplasme (Sarhan et al., 1997; Danyluk et al., 1998; Heyen et al., 2002). Pour la plupart des *DHN*, les plus fortes accumulations sont observées dans les tissus vasculaires et l'apoplasme des cellules les plus vulnérables à la nucléation de la glace et donc et aux dommages de gel (Houde et al., 1995; Danyluk et al., 1998; Nylander et al., 2001). Bien que leur fonction exacte soit encore peu connue, il est vraisemblable que les *DHN* jouent un rôle dans la stabilisation des structures cellulaires pour empêcher la déshydratation (Close, 1997; Danyluk et al., 1998; Yin et al., 2006). En effet, chez plusieurs espèces, il a été montré que les *DHN* possèdent une activité cryoprotectrice

(protection des cellules contre les dommages dus au gel) *in vitro* (Rinne et al., 1999; Hara et al., 2001; Bravo et al., 2003) et une activité antifreeze (adsorption à la surface des petits cristaux de glace naissants pour inhiber leur croissance et propagation) *in vivo* (Wisniewski et al., 1999). Elles auraient également un rôle de consolidation de l'activité enzymatique dans des conditions de faible activité de l'eau (Rinne et al., 1999), d'osmorégulation (Nylander et al., 2001), ou de nettoyage des radicaux libres (Hara et al., 2003). Les protéines DHN/DHN-like possèdent par ailleurs une activité de liaison à des ions (fer, calcium), ce qui suggère qu'elles peuvent agir comme transporteurs d'ions ou comme protéines chaperonnes-like calcium dépendantes (calreticuline et calnexine, Heyen et al., 2002; Alsheikh et al., 2003).

Quelques DHN ont été caractérisées. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, on distingue entre autres, la Responsive to ABA 18 (RAB18) qui s'accumule en réponse à l'ABA et aux stress hydrique et froid (Lang and Palva, 1992; Nylander et al., 2001), la Low Temperature Induced 29/Early Dehydration Induced 10 (LTI29/ERD10) qui s'accumule principalement sous l'action du froid (Kiyosue et al., 1994; Welin et al., 1994; Nylander et al., 2001), ou la Early Dehydration Induced 14 (ERD14) qui est présente dans les plantes non stressées et dont le niveau augmente en réponse à différents stress, en particulier hydrique (Kiyosue et al., 1994). Chez la luzerne, une DHN de réponse au froid appelée Cold Acclimation Specific 15 (CAS15) a été caractérisée par Monroy et al. (1993a).





## **Partie III.**

# **Cartographie de QTL de tolérance au gel chez *Medicago truncatula***

<b>PARTIE III. CARTOGRAPHIE DE QTL DE TOLERANCE AU GEL CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....</b>	<b>60</b>
I. OBJECTIFS ET DEMARCHE.....	60
A. Mise au point d'un test d'évaluation de la tolérance au gel chez l'espèce <i>Medicago truncatula</i> .....	60
B. Mise en œuvre de la détection de QTL de tolérance au gel et de variables associées à la capacité d'acclimatation au froid sur la population LR3 .....	64
II. RECHERCHE DE QTL DE DEGATS DE GEL ET DE PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES RELATIFS A L'ACCLIMATATION AU FROID CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....	64
TITLE .....	65
AUTHORS .....	65
ABSTRACT .....	66
INTRODUCTION .....	66
MATERIALS AND METHODS .....	68
Plant Material.....	68
Culture conditions.....	69
Visual freezing damage scoring.....	70
Electrolyte leakage assay .....	70
50% lethality temperature test (LT <sub>50</sub> , EXP1).....	71
Chlorophyll content (EXP2 and EXP3).....	72
Rubisco activity and total proteins determination (EXP2 and EXP3).....	72
Determination of the concentration of soluble sugars (EXP2) .....	72
Genetic mapping and QTL analysis.....	73
Statistical analyses .....	74
RESULTS .....	76
LT <sub>50</sub> and freezing damage tests in 15 <i>M. truncatula</i> accessions .....	76
Characterization of the F83.005-5 and DZA.045-5 <i>M. truncatula</i> lines.....	78
Genetic linkage map and QTL mapping.....	81
DISCUSSION .....	90
Genetic variability for freezing tolerance in <i>M. truncatula</i> .....	90
Characterization of the parental lines subjected to different temperature regimes.....	92
Genetic linkage map and QTL for freezing tolerance in <i>M. truncatula</i> .....	93
Potential for the understanding of freezing tolerance in cultivated legumes.....	96
SUPPLEMENTAL MATERIAL .....	96
ACKNOWLEDGEMENTS .....	98
REFERENCES .....	99

---

## Partie III. Cartographie de QTL de tolérance au gel chez *Medicago truncatula*

---

### I. Objectifs et démarche

Deux des objectifs de la thèse ont été traités dans cette partie. Il s'agissait d'une part de mettre au point et d'adapter chez *Medicago truncatula* des outils de phénotypage de la résistance au gel en condition contrôlée, et d'autre part, à partir de ce test de cartographier des QTL de tolérance au gel ainsi que de variables associées à la capacité d'acclimatation sur la population de lignées recombinantes dont on disposait pour ce travail (LR3).

#### A. Mise au point d'un test d'évaluation de la tolérance au gel chez l'espèce *Medicago truncatula*.

L'utilisation d'un test en conditions contrôlées s'est logiquement imposée dans cette étude. En effet, l'espèce *Medicago truncatula* est relativement sensible à des excès d'eau dans le sol et l'utilisation du dispositif multilocal au champ habituellement utilisé pour le pois (semis d'automne et résistance au gel évaluée en sortie d'hiver à Mons, Dijon et Clermont-Ferrand) ne paraissait pas adaptée. Par ailleurs, l'utilisation de conditions contrôlées garantissait la mise en œuvre d'un nombre suffisant d'expérimentations comparables dans un calendrier compatible avec la durée de la thèse. En me basant sur le protocole de test de la résistance au gel mis au point par l'équipe de l'UMR SADV sur l'espèce *Pisum sativum*, mon premier travail a été d'adapter le protocole à *Medicago truncatula* pour i), valider *a posteriori* le choix de la population LR3 pour la recherche de QTL de tolérance au gel et ii) mettre en œuvre le phénotypage correspondant sur LR3, mais aussi pour iii) évaluer une collection définie par l'équipe de Montpellier afin de quantifier la variabilité génétique pour ce caractère au sein de l'espèce et donner éventuellement des éléments d'orientation, en termes de choix de croisements, pour des études génétiques ultérieures. Dans l'ensemble, le but recherché pour ce test était de soumettre des plantules de *Medicago truncatula* à une cinétique de conditions de culture, composée de plusieurs phases permettant d'amener progressivement depuis des conditions optimales de croissance jusqu'au gel, en passant par une phase d'acclimatation.

Au début de ce travail, la biologie de cette plante nouvellement étudiée au centre INRA d'Estrées-Mons ne nous était pas encore familière. Or il fallait réaliser le phénotypage des plantes pour caractériser leur stade de développement avant de les soumettre au test de gel, et d'évaluer le niveau de dégâts observés. Comment les feuilles trifoliées étaient émises, à quel stade fallait-il soumettre les plantes au gel, et comment les caractériser, voilà certaines des questions auxquelles il a fallu répondre. Delphine Moreau qui faisait sa thèse à l'INRA de Dijon sur la détermination de la réponse du développement et de la croissance de *Medicago truncatula* aux facteurs environnementaux nous a fait profiter des outils de phénotypage qu'elle a mis au point pour analyser la variabilité génétique associée à la nutrition azotée. Ceci nous a permis de mettre au point nos propres outils de phénotypage pour la tolérance au gel. Ensuite, deux types de durée d'acclimatation ont été testés : une acclimatation de 10 jours et une acclimatation de 15 jours. L'acclimatation de 15 jours, combinée avec une durée de conditions optimale (Nursery) également de 15 jours s'était révélée plus favorable et suffisante pour détecter des différences de réponse au gel dans les quelques accessions de *Medicago truncatula* testées au départ. Une acclimatation de plus longue durée n'a donc pas été testée.

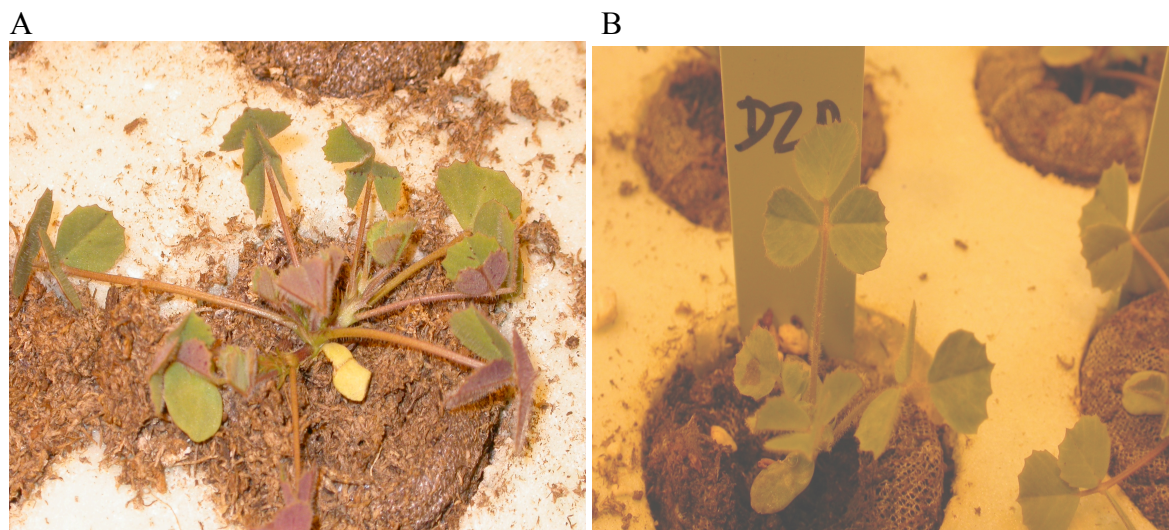
Puisque la mise au point du test d'évaluation de la tolérance au gel était basée sur une notation visuelle des dégâts de gel, il a fallu trouver la meilleure échelle de notation visuelle de ces dégâts pour rendre compte le plus fidèlement possible de l'effet du gel sur les différents génotypes. Pour ce faire, le niveau de dégât de gel était évalué par une gamme de notes allant de 0 pour une plante sans aucun dégât, à 5 lorsque la plante était morte. Des notes intermédiaires étaient données pour tenir compte de la variabilité observée chez les différentes plantes. Pour mettre au point ce système de notation, je me suis inspiré de ce qui se faisait chez le pois avant le début de la thèse, et il a fallu le réadapter à *Medicago truncatula*. Pour illustrer ceci, voici quelques photos montrant le dispositif expérimental en chambre climatisée (Figure III-1) ainsi que le système de notation des dégâts de gel à travers quelques exemples (Figure III-2). La Figure III-3 montre présente une comparaison succincte entre F 83005-5 et DZA 045-5.



Figure III-1 : Photo illustrant le dispositif expérimental de l'évaluation de la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*.  
Source Komlan Avia.



Figure III-2 : Photos illustrant la notation de dégât de gel sur quelques lignées de *Medicago truncatula*.  
Note 0 (en haut à gauche) ; note 2 (en haut à droite) ; note 4 (en bas à gauche) et note 5 (en bas à droite).



*Figure III-3 : Photos de plantules des deux parents de la LR3 pendant une cinétique d'acclimatation.*

*A : F 83005-5, génotype tolérant, port étalé pendant l'acclimatation, feuilles anthocyanées au froid.*

*B : DZA 045-5, génotype sensible, port dressé.*

## **B. Mise en œuvre de la détection de QTL de tolérance au gel et de variables associées à la capacité d'acclimatation au froid sur la population LR3**

Les protocoles établis au cours de la première étape ont permis d'évaluer le phénotype de la population LR3 pour les dégâts observés sur l'appareil aérien après une période de gel, mais aussi pour des variables associées à la capacité d'acclimatation au froid qui est généralement développée au cours de la période de températures basses mais positives qui précède la période de gel proprement dite. Cette démarche est menée en parallèle par l'équipe sur l'espèce *Pisum sativum* car elle permet de mettre en évidence des fonctions candidates pour lesquelles des QTL colocalisent avec des QTL de résistance au gel (Dumont et al. 2008). Il était important, dans le cadre de ma thèse, de pouvoir fournir de premiers éléments de comparaison entre *Pisum sativum* et *Medicago truncatula* pour la résistance au gel et des variables explicatives liées à la capacité d'acclimatation au froid pour alimenter la cartographie comparative de QTL et de gènes candidats entre les deux espèces. Compte tenu de la taille de la population de lignées recombinantes de 178 individus et de la place limitée dans les chambres climatisées, le nombre de caractères à mesurer (en tenant compte des répétitions nécessaires avec un nombre conséquent de plantes pour chacune) était limité. On a décidé alors de prioriser des caractères dont certains étaient non destructifs afin d'en mesurer un maximum en une seule expérimentation. On a ainsi pu mesurer les composantes de la biomasse (matière fraîche et sèche, le nombre de feuilles), la surface foliaire, la teneur en chlorophylle en utilisant une méthode non destructive, ainsi que la fuite d'électrolytes des feuilles après la période de gel. Sur les deux parents de la population, d'autres caractères avaient été mesurés : les sucres solubles et l'activité de la Rubisco, le but étant de caractériser leur comportement au gel en relation avec les changements physiologiques et biochimiques intervenant pendant la phase d'acclimatation.

## **II. Recherche de QTL de dégâts de gel et de paramètres physiologiques relatifs à l'acclimatation au froid chez *Medicago truncatula***

Cette partie a fait l'objet d'un article rédigé et soumis à *Journal of Experimental Botany*.



## Title

**Diversity and QTL mapping for freezing tolerance in *Medicago truncatula***

## Authors

**Komlan Avia<sup>1,a</sup>, Marie-Laure Pilet-Nayel<sup>2</sup>, Nasser Bahrman<sup>1</sup>, Alain Baranger<sup>2</sup>, Bruno Delbreil<sup>3</sup>, Véronique Fontaine<sup>1</sup>, Céline Hamon<sup>2</sup>, Eric Hanocq<sup>1</sup>, Martine Niarquin<sup>1</sup>, Hélène Sellier<sup>1</sup>, Christophe Vuylsteker<sup>3</sup>, Jean-Marie Prosperi<sup>4</sup> and Isabelle Lejeune-Hénaut<sup>1,\*</sup>**

## Addresses:

<sup>1</sup> INRA, UMR 1281 SADV, Estrées-Mons BP 50136, F-80203 Péronne, France

<sup>2</sup> INRA, UMR 118 APBV, Domaine de la Motte BP 35327, F-35653 Le Rheu, France

<sup>3</sup> USTL, UMR 1281 SADV, Bâtiment SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>4</sup> INRA, UMR 1097 DIAPC, Domaine de Melgueil, F-34130 Muguio, Montpellier, France

<sup>a</sup> Komlan Avia's present address: University of Oulu, Department of Biology, PO Box 3000, FIN-90014 Oulu, Finland

\* **Correspondence:** Isabelle Lejeune-Hénaut

**address:** INRA, UMR 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés  
Estrées-Mons BP 50136, F-80203 Péronne, FRANCE

**telephone:** 33 3 22 85 75 07

**fax :** 33 3 22 85 69 96

**e-mail :** [Isabelle.Lejeune@mons.inra.fr](mailto:Isabelle.Lejeune@mons.inra.fr)

**Date of submission:** 21 April 2009

**Number of tables and figures:** 5 tables and 7 figures

**Running title:** Freezing tolerance in *Medicago truncatula*.

## Abstract

QTL mapping of freezing tolerance and related physiological traits was conducted in the model legume *Medicago truncatula* Gaertn. In a first stage, a large variation for freezing tolerance among fifteen *M. truncatula* accessions was observed. Differences in physiological parameters such as Rubisco activity, electrolyte leakage, soluble sugars contents, chlorophyll content and biomass accumulation were explored between the two *M. truncatula* lines F83.005-5 and DZA.045-5. A F5 RIL population derived from the cross between these lines was used to detect QTL for freezing damage and related parameters in *M. truncatula*. Co-localizations between several of the analyzed traits were observed on LG1, LG4 and especially LG6, where the most explanatory freezing damage QTL ( $R^2=40\%$ ) coincided with those of electrolyte leakage, chlorophyll content, root weight and number of leaves. The impact of these results is discussed for their potential application to understand freezing tolerance in other legumes species, particularly for winter pea (*Pisum sativum* L.), taking into account the macro- and micro-synteny between legume genomes.

## Key words

*Medicago truncatula*, freezing tolerance, cold acclimation, QTL, electrolyte leakage, Rubisco, soluble sugars.

## Introduction

Freezing temperature is one of the most important factors limiting the distribution of plant species (Levitt, 1980). Most plants from temperate regions increase freezing tolerance in response to low non freezing temperatures, a process known as cold acclimation. Due to fundamental and applied interests, the physiological and molecular bases of cold acclimation have been studied in many plants. Consistent physiological features of cold acclimation have been reported among which a general up-regulation of primary metabolism, solute accumulation, changes in membrane physical properties and activation of the protection against oxidative stress (Pearce, 1999). More particularly, an increase of the photosynthetic activity is often stated, associated with an increased activity of key enzymes of the photosynthesis process such as Rubisco (Holaday *et al.*, 1992). Likewise, an accumulation of soluble sugars which contributes to maintain the cell integrity is generally reported during cold acclimation (Olien and Clark, 1993; Xin and Browse, 2000).

The understanding of the molecular bases of cold acclimation has also improved in the past years, reports showing mainly that most physiological changes during cold acclimation in the model plant *Arabidopsis thaliana* are associated with changes in gene expression (Thomashow, 1999). The cold stress signal is initiated by the plasma membrane rigidification followed by cytoskeleton rearrangement, Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup>-dependant phosphorylation. From this point, the major pathway leading to cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* is the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) response pathway. The CBFs are rapidly induced in response to low temperature followed by expression of the CBF-targeted genes (the CBF regulon) which contribute to increase freezing tolerance. The major role played by CBFs has also been pointed out by QTL analysis showing that CBF genes colocalize with freezing tolerance QTL in the model species itself (Alonso-Blanco *et al.*, 2005) as well as in cultivated species like barley or wheat (Vagujfalvi *et al.*, 2003; Francia *et al.*, 2004). It is however now known that non-CBF transcription factors are also involved in the regulation of the cold responsive transcriptome (Vogel *et al.*, 2005). Moreover, it has been shown that post-transcriptional and post-translational regulations play critical roles during cold acclimation (Chinnusamy *et al.*, 2007).

Pea (*Pisum sativum* L.) is a temperate legume crop, important in Europe as a protein-rich feedstock source that would benefit from a better freezing tolerance. Autumn-sown varieties would increased seed yields due to a longer development cycle allowing to produce a higher biomass, but they have first to survive the winter freezing periods. It is thus important to decipher the genetic determinism of freezing tolerance for this species. QTL controlling freezing tolerance have recently been identified in pea (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) but the identification of genes underlying these QTL is still lacking. In lentil, another annual legume, QTL mapping of winter hardiness was realized but did not point out any genetic linkage with a developmental gene (Kahraman *et al.*, 2004). However, in the perennial legume *Medicago sativa*, coincident QTL were found for winter hardiness and fall dormancy which is a developmental factor triggered by short days and cool temperatures (Brouwer *et al.*, 2000). To better understand factors that control freezing tolerance in legumes, candidate genes arising from model species would be worth consideration.

*Medicago truncatula* is a model legume that shows a high level of synteny with pea (Choi *et al.*, 2004b; Aubert *et al.*, 2006) and has a genome which sequence is under completion (Young *et al.*, 2005). Despite origin and cropping regions restricted to Mediterranean climates, freezing tolerance variability has already been reported in *Medicago truncatula* (Hekneby *et al.*, 2001; Brandsaeter *et al.*, 2002; Pennycooke *et al.*, 2008). However

information is still lacking about the localization of the genome regions controlling this trait. Exploring the genetic variability and identifying genetic factors for freezing tolerance in *Medicago truncatula* should therefore enhance the understanding of freezing tolerance in legumes and facilitate applications towards cultivated species.

The objectives of this work were to (a) check for natural variability for freezing tolerance in a collection of fifteen accessions from diverse geographical origins, (b) to compare physiological traits involved in the cold acclimation process between two contrasted accessions and (c) to detect QTL for freezing tolerance and cold acclimation related traits among a population of recombinant inbred lines derived from the contrasted accessions.

## Materials and methods

### *Plant Material*

*Collection lines:* A set of 15 *M. truncatula* accessions was used for freezing tolerance tests (Table 1). They were provided by INRA of Mauguio (Montpellier, France: <http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>). They included (a) 11 inbred lines derived from populations that represent the diversity existing in the collection of populations maintained by INRA of Mauguio, among which 8 from the *M. truncatula* core collection 8 (CC8) that match broad geographic origins (Ronfort et al., 2006), (b) the reference line Jemalong A17 and (c) three additional accessions chosen for particular characteristics: DZA.220-H is a population belonging to the tricycla subspecies of *M. truncatula* which is not included in the CC8 core collection, ESP.096-A is an inbred line which was collected from a high altitude site in the south of Spain and F34.042-D is a population which was collected from one of the highest latitude site in the north of Montpellier (France).

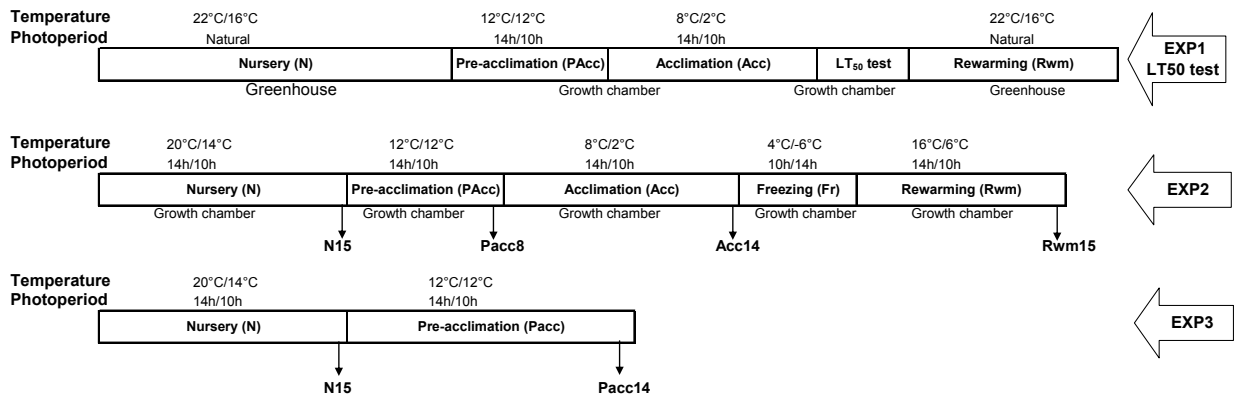
*Recombinant Inbred Lines (RILs):* Two inbred line accessions, DZA.045-5 (used as male), originating from Algeria and F83.005-5 (used as female), originating from Salernes, France, were crossed to generate a segregating population of 178 F5-derived recombinant inbred lines (namely LR3) produced by single seed descent. DZA.045-5 is derived from the same population as DZA.045-6, which is present in the set of 15 collection lines, and no molecular difference was found between both lines (J.-M. Prospero, personal communication). Therefore, the freezing tolerance scores of DZA.045-6 were supposed to be representative of the parental line DZA.045-5.

### *Culture conditions*

*Germination:* After scarification with sandpaper, seeds were placed in 2ml deionised water-containing Eppendorf tubes for 6-hours imbibition at room temperature. Seeds were then spread on wet filter paper-containing Petri dishes. To break dormancy and allow rapid and synchronized germination, the Petri plates were maintained at 4°C in the dark for 3 days. They were then transferred to 20°C at natural photoperiod and were planted after 2 days.

*Sowing, Temperature, light intensity and photoperiod settings:* Plantlets were placed in home-made polystyrene blocks, of 100 or 50 holes each, which were used for all experiments that comprised a freezing period, in order to protect roots from freezing injury since roots are thought to be more susceptible to frost than shoots (Chen *et al.*, 1983). Each hole was half filled with perlite to promote the development of roots and a 38mm well-moistened (water-saturated for up to 3 hours) Jiffy-7 pellet made of sphagnum peat (<http://www.jiffypot.com/Products.asp>) was inserted in each of them. Lime and a special fertilizer with low ammonium content were pre-added to the peat in order to stimulate growth. One germinated seed was inserted in each pellet and was gently watered to allow a firm anchoring in the substrate. During the nursery phase, the seedlings were gently and frequently watered with deionised water to avoid desiccation of the roots. To prevent a premature yellowing of the leaves, about 10 ml fertilizer was added in the pellets; this was performed about once a week by using the commercial liquid fertilizer NPK 6:3:6 mixture supplemented with micronutrients (Substral®, SCOTTS), according to European Molecular Biology Organization practical course available at <http://www.isv.cnrs-gif.fr/embo01/manuels/index.html>.

Three types of experiment were conducted (Fig. 1): EXP1 for LT<sub>50</sub> assays, EXP2 for RILs studies, parental lines characterization and freezing damage test for 15 *M. truncatula* accessions and EXP3 for parental lines characterization with only two different temperature phases. Each experiment was made up of different phases represented by: N for Nursery phase, PAcc for Pre-Acclimation phase, Acc for Acclimation phase, Fr for freezing phase and Rwm for Rewarming phase. The PAcc phase was used to decrease temperature progressively before acclimation *sensu stricto* to prevent plants from a cold shock if shifting them from 20°C to 2°C. Experiments (except Nursery and Rewarming phases of EXP1, see Fig. 1) were performed in a growth chamber (DAGARD; size: 3.2 x 3.2 x 2.4m; type: MA 100, class M1) lighted by a combination of two types of PHILIPS lamps: HPI-T400W (metal iodide) and SON-TP400W (high-pressure sodium), with a mean photosynthetic active radiation (PAR) of 450  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .



**Figure 1.** Experimental conditions. Three different types of experiments were used in this study: EXP1 for LT<sub>50</sub> test in the 15 *M. truncatula* accessions, EXP2 for RILs study, parental lines characterization and freezing damage test for the 15 *M. truncatula* accessions and EXP3 without the acclimation phase for parental lines characterization. Arrows show the sampling dates in EXP2 and EXP3.

*Sampling:* For all experiments, each genotype was represented by 18 individuals displayed in three blocks. Experiments were repeated twice and three times for RILs tests.

*Growth characterization:* Plant developmental stage (number of leaves, NOL) was determined by counting all visible trifoliolate leaves weighted by their folding decimal code (Moreau et al., 2006). Leaf area was determined by taking pictures of detached leaves spread out on a white paper sheet and analyzing them with the OPTIMAS 6.5 image processing program (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Shoots and roots dry weight was determined after oven-drying them for 72-h at 70°C.

#### *Visual freezing damage scoring*

The levels of freezing damage (freezing damage score, FDS) were recorded on a daily basis during the freezing phase and two weeks after the end of the freezing phase. These records were referred to as FDS followed by the number of elapsed days under freezing conditions (FDS1D to FDS8D for FDS at 1 day to FDS at 8 days) and FDS2W for FDS at two weeks under rewarming conditions (Rwm15, Fig. 1). Plants were individually given a score from 0 (no damage) to 5 (dead). The plants were scored 1 for frost burn limited to the leaf edges, 2 for frost burn on the majority of the leaf surface, 3 for frost burn on upper third of the stem, 4 for frost burn on upper three-quarters of the stem, as described for pea by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008).

#### *Electrolyte leakage assay*

Three trifoliolate leaves of each plant sampled after 2 weeks of the rewarming phase were detached and placed in a 50ml tube containing 25 ml of ultra-pure water. The tubes were kept

at room temperature for about 20h; they were shaken before measuring the conductivity of the solution (C1) with an ION check30 conductivity meter (Radiometer Analytica). The tubes were then frozen for a minimum of 1 day at -80°C and thawed over night at room temperature. Thereafter they were shaken and the total potential conductivity (C2) was measured. The mean electrolyte leakage was calculated as a percentage of the total leakage from frozen samples ( $C1/C2 \times 100$ ).

*50% lethality temperature test (LT<sub>50</sub>, EXP1)*

Germinated seeds were planted in a greenhouse under natural photoperiod in September 2007, at 22/16°C day/night temperature and 60/70% day/night relative humidity. Additional light was provided by PHILIPS high-pressure sodium lamps SON-T AGRO when light intensity decreased below a threshold of 85 watts.m<sup>-2</sup> within a minimum of 14 hours-period a day. Moisture and nutrient levels were routinely maintained with the NPK 6:3:6 nutrient solution described above. After 5 weeks, plants were transferred to a growth chamber with a 14-h photoperiod and a 12/12°C day/night temperature for 5 days followed by 8/2°C day/night for 10 days for acclimation (Fig. 1). Control plants of each line were maintained under the greenhouse conditions. In the growth chamber, after the acclimation period, the temperature was allowed to decrease from 2°C to -2°C at the rate of 2°C per 1.5 h. At -2°C plant were misted with tap water and little ice crystals from a wetted brush dipped in liquid nitrogen were sprayed on the surface of leaves to initiate ice nucleation. Then plants were allowed to equilibrate for two hours before further temperature decreases. Temperature was decreased from -2 to -10°C at the rate of 2°C per 1.5 h and each step temperature was held constant for 30 min. For each line, six plants from each of the three blocks were carried out and placed in another growth chamber at 4°C to thaw over night. Several temperature sensors were randomly placed amongst the test plants to evaluate temperature variation within the growth chamber. This variation was approximately of 0.5°C and its effects were considered to be taken into account by the blocks.

On the following day, electrolyte leakage test was performed as described above. Three tubes were measured for each line and each step temperature. LT<sub>50</sub> (50% lethality temperature) was determined using SYSTAT Sigmaplot 10 to evaluate the four parameters of the sigmoidal regression equation  $y=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$  where a=upper asymptote minus y<sub>0</sub> or difference between maximum and minimum potential electrolyte leakage; b=inflection point slope, x<sub>0</sub>=temperature at inflection point and y<sub>0</sub>=lower asymptote or minimum potential electrolyte leakage. The LT<sub>50</sub> temperature was then calculated as x for y=50%. After sampling

for electrolyte leakage measurement, plants were returned to initial conditions in the greenhouse and a visual re-growth assessment was performed after two weeks.

#### *Chlorophyll content (EXP2 and EXP3)*

A non destructive measurement of the chlorophyll content was performed on five leaves per plant and three times on each leaf with a hand-held chlorophyll content meter CCM-200 (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA) which provides an index (chlorophyll content index, CCI) estimating the leaf chlorophyll content (Richardson et al., 2002; Biber, 2007). The RILs were compared to each other on their index basis.

#### *Rubisco activity and total proteins determination (EXP2 and EXP3)*

For Rubisco activity measurements, frozen leaves were crushed and the proteins extracted with 500  $\mu$ L of buffer (100 mM bicine pH8.2, 1 mM EDTA, 20 mM  $MgCl_2$ , 5 mM DTT, 10% (v/v) glycerol and inhibitors cocktail (Sigma)) added to 500 mg of fresh material. Tubes were well shaken and centrifuged at 21000g, for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and centrifuged once again. Rubisco activity was evaluated by measuring NADH oxidation at 30°C with a CARY50 Bio (Varian, Australia Pty Ltd) spectrophotometer at the absorbance of 340 nm. The total activity was assayed after 10  $\mu$ L of extract was activated in a 1 mL activation mixture containing 100 mM bicine KOH pH8, 25 mM  $NaHCO_3$ , 20 mM  $MgCl_2$ , 0.25 mM NADH, 3.5 mM ATP, 5 U/mL-1 Gal3PDH, 5 U/mL-1 3PGK, 5 U/mL-1 creatine phosphokinase, 5 U/mL-1 phosphocreatine, and 0.5 mM RuBP added after 15 min incubation (Marco and Tricoli, 1983; Ward and Keys, 1989). Initial Rubisco activity was determined in the same way, without the incubation period. Rubisco activity was expressed as nanomoles RuBP degraded per second (nanokatal) and per mL or related to total proteins unit. The Rubisco activation was calculated as (initial activity/total activity)\*100. Total soluble proteins were measured by the standard method of Bradford (1976).

#### *Determination of the concentration of soluble sugars (EXP2)*

Shoots and roots were sampled from six plants x three blocks at N15, PAcc8 and Acc14 phases. Fructose, glucose and sucrose contents were determined from lyophilized samples with 80% ethanol at 70°C using three successive extractions of 1 mL, 0.5 mL and 0.2 mL. Supernatants were pooled and dried in a speedVac. Dried residues were re-suspended in 150  $\mu$ L of distilled water for shoots and 100  $\mu$ L for roots, filtered, diluted and assayed with a Prominence system HPLC. The separation was obtained on an Alltech OA-1000 organic acids column (300 mm  $\times$  6.5 mm) with 0.01 N  $H_2SO_4$  mobile phase in 20 minutes runs. The flow was 0.4 mL.min<sup>-1</sup> and the column was heated to 40°C. The peaks corresponding to fructose, glucose, and sucrose were detected with a refractive index detector (RID-10A, Shimadzu).



The use of standards allowed determining the concentration of the different metabolites with the LC solution software (Shimadzu). For each sample, the sugar content was expressed as  $\text{mg.g}^{-1}$  of dry matter.

#### *Genetic mapping and QTL analysis*

*DNA extraction and molecular marker amplification:* Young leaves were harvested on 4-week-old plants from the 178 F5-derived RILs and the two parental lines (10 plants/line). DNA of each RIL was extracted from approximately 1g of leaf tissue according to Doyle and Doyle (1990).

AFLP analyses were mainly conducted as described by Vos *et al.* (1995). Genomic DNA was digested by *EcoRI* plus *MseI* restriction enzymes. After ligation of double-stranded adaptors to the ends of the restriction fragments, pre-amplification was performed with *EcoRI* and *MseI* primer pairs, with one selective nucleotide at their 3'-end. The selective amplification was then performed with *EcoRI* and *MseI* primer pairs with two or three selective nucleotides at their 3'-end. The *EcoRI*+2/3 primers were labelled with either infrared dye IRD700 or IRD800 fluorochrome (MWG Biotech). Electrophoresis of the amplified products was carried out on 5.5% denaturing polyacrylamide sequencing gel and polymorphic bands were detected with a LICOR IR<sup>2</sup> automated Sequencer (LI-COR Biosciences). Image analysis of AFLP fragments was conducted using AFLP Quantar-Pro software v1.04 (Keygene, Wageningen, The Netherlands), according to the manufacturer's instructions. AFLP markers were generated following polymorphism tests using 64 selective AFLP primer pairs, from the four *EcoRI*-AN (N) primers used in Thoquet *et al.* (2002) and 16 *MseI*-CNN primers (Table S1). Each AFLP marker was named using a code for the *EcoRI/MseI* primer combination as defined by the international nomenclature, followed by the length of the fragment (in base pairs) estimated by AFLP Quantar-Pro.

All SSR amplifications were carried out using the procedure described for pea by Lorigon *et al.* (2005), with fluorescently labelled (IRD 700 or IRD 800) forward primers and an annealing temperature ( $T_m$ ) of 55°C. Amplified products were separated upon electrophoresis in a 6.5 % denaturing polyacrylamide gel, and visualized on a LICOR IR<sup>2</sup> automated Sequencer (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Polymorphic bands were scored visually. SSR markers were derived from previous studies reporting on development of SSR markers from *M. truncatula* EST sequences (Julier *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2005) or from *M. truncatula* sequenced BAC clones (Mun *et al.*, 2006). Genebank EST or BAC identification number, SSR repetitive motifs and primer sequences are described for most of SSR markers as electronic supplementary material in Julier *et al.* (2003), Gutierrez *et al.* (2005) and Mun *et al.*

(2006). Information on 11 additional SSR markers is indicated in Table S2 (Huguet, unpublished). SSR markers from Julier *et al.* (2003) and Gutierrez *et al.* (2005) are designed “MTIC” followed by the SSR number. SSR markers from Mun *et al.* (2006) are named “MtB” followed by the SSR number.

RAPD amplifications were carried out from Operon primers (Operon Technologies, Alameda, CA, USA), according to the procedure described for pea by Laucou *et al.* (1998). Amplified products were separated upon electrophoresis in 2% agarose gels, and then visualized under UV light using ethidium bromide stain. RAPD markers were generated following polymorphism tests using 18 Operon RAPD primers, previously used by Thoquet *et al.* (2002) to generate the *M. truncatula* Jemalong-6 x DZA.315-16 (F2) genetic map. RAPD markers were named using the Operon primer name (kit letter + primer number) followed by the length of the fragment in base pairs.

EST-CAPS amplifications and revelations were conducted using primer sequences and protocol described by Choi *et al.* (2004a).

*Genetic linkage analysis:* Genetic linkage analyses were performed using MAPMAKER/EXP, version 3.0 (Lincoln *et al.*, 1992), with a LOD score threshold of 3.0 and a recombination frequency  $\leq 0.4$ . Marker order was established using the ‘order’ command. Centimorgan distances were expressed with the Kosambi function. Adjustment of each marker segregation to the expected 1:1 Mendelian ratio was analyzed using a Chi-2 test ( $\alpha=0.05$ ).

*QTL analyses:* QTL analyses were performed with Windows Cartographer V2.5 (Wang *et al.*, 2007). Composite Interval Mapping (CIM) was run using model 6. For each trait, the LOD significance threshold was determined after running 1000 permutations test ( $\alpha=0.05$ ). Cofactors were selected with the Forward and Backward regression method. The confidence interval of QTL position was estimated as the interval between positions where the LOD value decreased by 1 and 2 units respectively, relatively to that of the most likely position. The software Mapchart 2.2 (Voorrips, 2002) was used to draw the QTL on the map.

#### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed with SAS statistical package v8.01 procedures (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; 2000). The RILs genotypic means adjusted from replication effect were calculated with the LSMEAN statement of the general linear model (GLM) procedure. The normality of residual distributions was tested with Skewness, Kurtosis and Shapiro-Wilk statistics displayed by the “univariate” procedure. This procedure was also used to detect abnormal residues.

Broad-sense heritabilities were assessed for the mapped traits using the model:

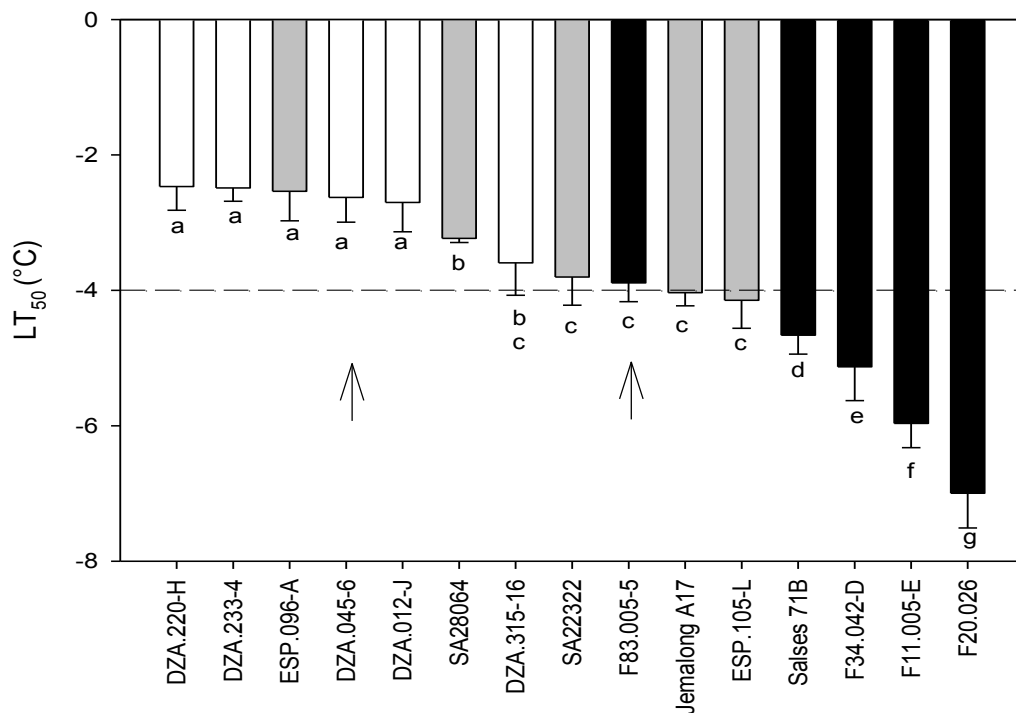
$$Y_{ijk} = \mu + G_k + rep_j + G_k \times rep_j + e_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  represents the value of the trait under investigation for the genotype  $k$  at the replication  $j$ ,  $G$  represents the genotypic effect and  $rep$  the replication effect.  $e_{ijk}$  is the error term of the model. Heritability was calculated as  $h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_e^2 / J)$  where  $\sigma_G^2$  represents the genetic variance,  $\sigma_e^2$  the environmental variance and  $J$  the number of replications. Heritability standard errors were calculated as defined by Holland *et al.* (2003).

## Results

### *LT<sub>50</sub> and freezing damage tests in 15 M. truncatula accessions*

To evaluate the variability for freezing tolerance in a collection of 15 *M. truncatula* accessions, 50% lethality temperature ( $LT_{50}$ ) test evaluated by conductivity assay, was performed in acclimated plants, following the EXP1 protocol (Fig. 1). DZA lines (originating from Algeria, except DZA.315-16) together with ESP.096-A (originating from southern Spain) were the most susceptible lines, with an  $LT_{50}$  varying from -2.5 to -3°C (Fig. 2). Except for F83.005-5 ( $LT_{50}$  = -3.9°C), French lines (Salses 71B, F34.042-D, F11.005-E and F20.026) were the most tolerant. The  $LT_{50}$  of the most tolerant line (F20.026) was 2.8-fold higher than that of the most sensitive line (DZA.220-H).



**Figure 2.**  $LT_{50}$  of 15 *M. truncatula* accessions. Letters under each bar represent means difference grouping based on the Student-Newman-Keuls (SNK) test. The dotted horizontal line shows the  $LT_{50}$  temperature threshold of -4°C found in Jemalong by Pennycooke et al. (2008) to be the freezing resistance level in *M. truncatula*. French accessions are shown with black bars and Algerian accessions with white bars. The parental accessions of the RIL population LR3, further used in this study, are shown with arrows.

A visual observation of freezing damage (FDS2W) was performed on plants grown under EXP2 conditions after the 15-days rewarming period (Rwm15, Fig. 1). The results were consistent with the conductivity scores, especially regarding the most and least tolerant

**Table 1.** Fifteen *M. truncatula* accessions lines analyzed for freezing tolerance with their agro-ecological descriptions and freezing damage scores after 2 weeks under rewarming conditions (FDS2W). Core collection information is provided according to the website: <http://www.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/>.

Accession Number	Accession name	Collection	Country of origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Annual rain (mm)	Occurring annual frost	FDS2W	Stat. SNK grouping
L000368	DZA.012-J	Inbred line	Algeria	36.55 N	3.18 E	200	600-900	No frost	4.0	a
L000736	DZA.045-6	Inbred line	Algeria	36.92 N	7.74 E	100	600-900	No frost	3.7	a b
L000422	ESP.096-A	Inbred line	Spain	36.98 N	3.14 W	1200	600-900	Light	3.5	a b
L000174	SA28064	Inbred line	Cyprus	34.78 N	33.17 E	550	-	-	3.4	b
L000542	DZA.233-4	Inbred line	Algeria	35.85 N	4.95 E	1370	400-600	Light (-2.7°C)	3.2	b c
L000163	SA22322	Inbred line	Syria	35.02 N	37.10 E	500	-	-	3.2	b c
L000530	F83.005-5	Inbred line	France	43.56 N	6.13 E	260	-	Light to average	3.2	b c
L000734	DZA.315-16	Inbred line	Algeria	34.72 N	0.16 E	1070	300-400	No frost	3.0	b c
L000738	A17 (Jemalong)	Inbred line	Australia	-	-	-	-	-	2.8	c d
L000544	ESP.105-L	Inbred line	Spain	38.08 N	3.81 W	350	400-600	No frost	2.5	d e
L000541	DZA.220-H	Population	Algeria	34.51 N	3.46 E	1050	150-300	Light (-0.7°C)	2.4	d e
L000651	Salses 71B	Inbred line	France	42.80 N	2.93 E	5	-	Light	2.3	d e f
L000460	F20.026	Inbred line	France	42.92 N	9.36 E	20	600-900	Light	2.0	e f
L000551	F34.042-D	Population	France	43.70 N	3.77 E	150	600-900	Light to average	1.9	e f
L000549	F11.005-E	Inbred line	France	43.10 N	3.09 W	10	-	Light to average	1.8	f

groups, except DZA.220-H which was in the most sensitive group determined by the  $LT_{50}$  evaluation, but was classified in the most tolerant lines under visual assessment by freezing damage score (FDS2W, Table 1). However this result concerning DZA.220-H can be explained by the fact that it is the only line belonging to the *tricycla* subspecies of *M. truncatula*, with dwarf morphology, i.e. small size of aerial organs that could help plantlets to survive frost and recover after the rewarming period, despite high electrolyte leakage for detached leaves. There was globally a positive correlation between FDS2W and  $LT_{50}$  ( $r = 78.5\%$ ).

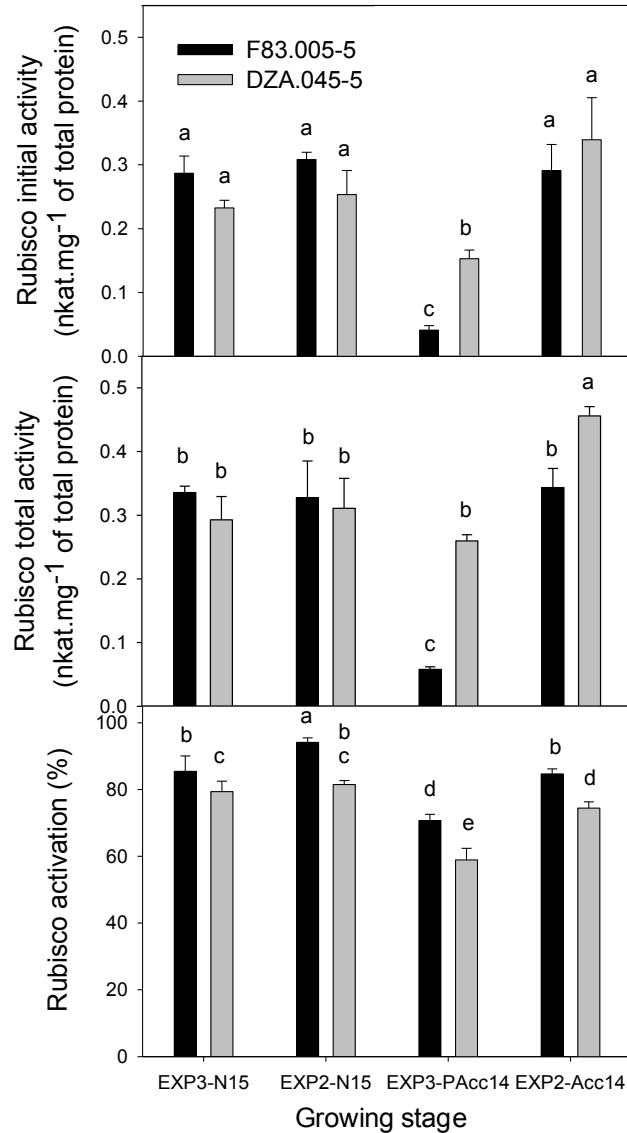
The comparison between the latitude of the area of collection for each accession and their freezing damage score (FDS2W) showed a relationship between the freezing damage and the geographic origin of the accessions. As expected, accessions prospected at higher latitudes (France) exhibited low FDS2W while those collected at lower latitudes (Algeria, Cyprus) showed high FDS2W. F83.005-5 and DZA.220-H were the exceptions for this general tendency based on the visual freezing damage scoring.

#### *Characterization of the F83.005-5 and DZA.045-5 M. truncatula lines*

##### *Rubisco activity*

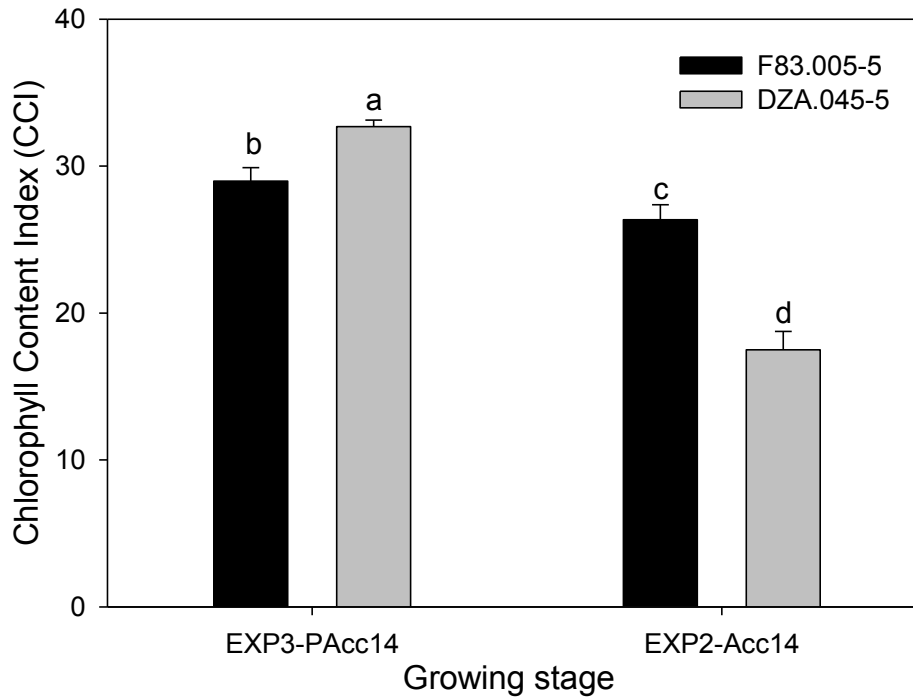
Samples from the two parental lines F83.005-5 and DZA.045-5 were assayed for Rubisco activity and activation. Until N15 stage in either EXP2 or EXP3, plants were subjected to the same temperature conditions although being assayed in different experiments. As expected, Rubisco activity levels at EXP2-N15 and EXP3-N15 remained identical overall at the end of the nursery phase (Fig. 3). At EXP2-Acc14, plants have passed through 8 days pre-acclimation at 12/12°C (day/night) followed by 14 days acclimation at 8/2°C after the nursery phase, while at EXP3-PAcc14 they have passed through 14 days pre-acclimation at 12/12°C after the nursery phase. Surprisingly, at EXP3-PAcc14, the susceptible parent DZA.045-5 had higher Rubisco initial and total activities than the tolerant F83.005-5 parent, while the activation of the latter was higher. Moreover, at EXP2-Acc14, while there was no significant difference between their initial activities, the total Rubisco activity was higher for DZA.045-5 than for F83.005-5 but ranged at the opposite for activation percentages.

**Figure 3.** Rubisco initial and total activities and Rubisco activation in leaves of F83.005-5 and DZA.045-5. EXP2 and EXP3 correspond to the experiments; they are followed by the name of the sampling stage: N15 for the fifteenth day of the Nursery phase, PAcc14 for the fourteenth day of the Pre-Acclimation phase and Acc14 for the fourteenth day in the Acclimation phase. Means comparisons are shown by SNK grouping letters above the bars.



#### *Chlorophyll content index (CCI)*

Unlike the Rubisco activity, the CCI was higher at EXP3-PAcc14 than at EXP2-Acc14 (Fig. 4). This means that, reducing temperature further below 12°C had a negative impact on the CCI, especially for DZA.045-5. Like for the Rubisco activity, at EXP3-PAcc14, DZA.045-5 had a higher CCI than F83.005-5.

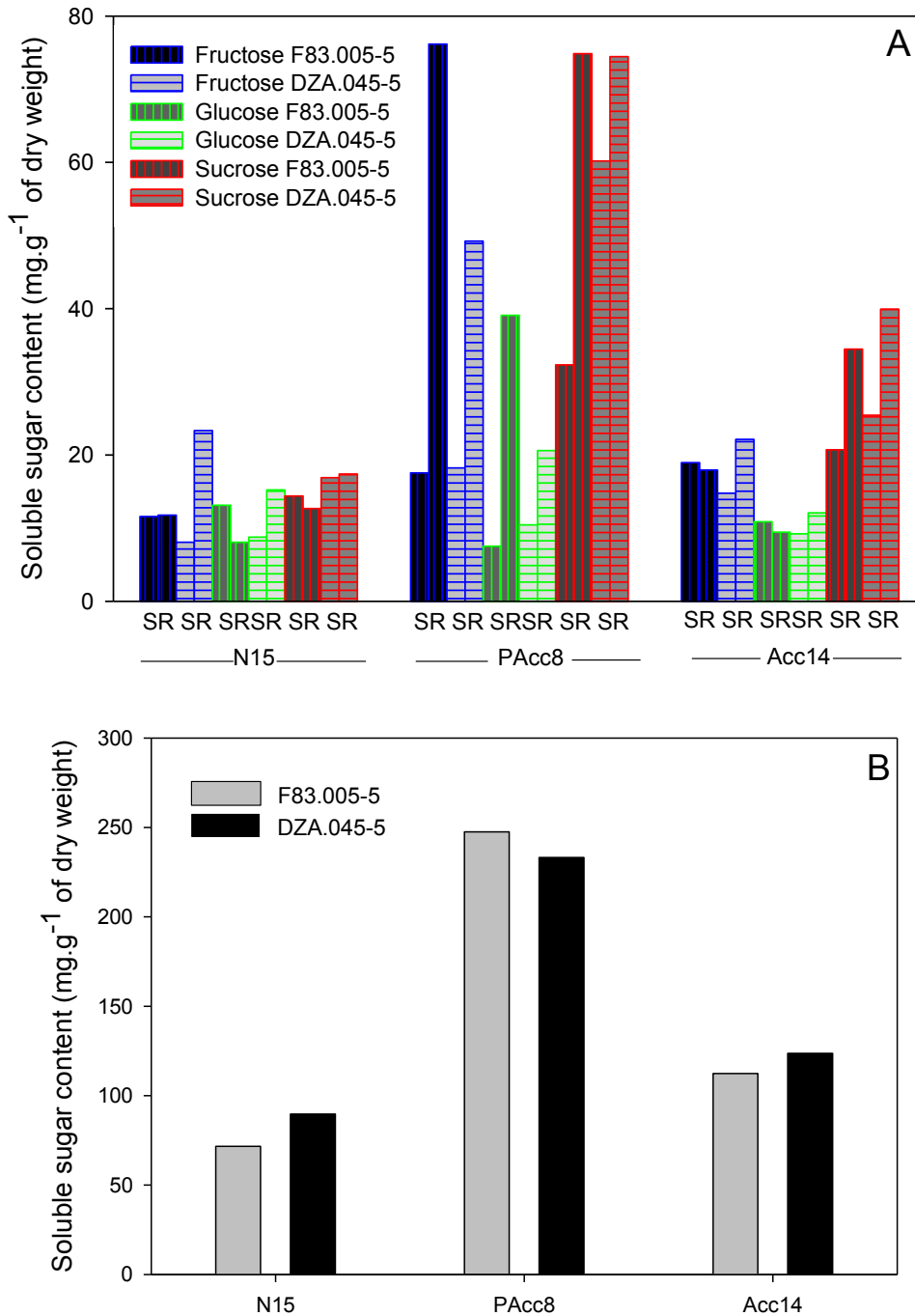


**Figure 4** Chlorophyll content index (CCI) of the parental lines F83.005-5 and DZA.045-5. EXP2 and EXP3 correspond to the experiments; they are followed by the name of the sampling stage: N15 for the fifteenth day of the Nursery phase, PAcc14 for the fourteenth day of the Pre-Acclimation phase and Acc14 for the fourteenth day of the Acclimation phase. Means comparisons are shown by SNK grouping letters above the bars.

#### *Soluble sugars contents*

After 8 days at 12/12°C (EXP2-PAcc8), contents of soluble sugars, especially in roots increased strongly, but after acclimation at 8°C/2°C and before freezing (EXP2-Acc14), the contents decreased significantly (Fig. 5A). Decreasing temperature from 20°C/14°C (normal growing conditions) led to increased sugar concentration, but 12/12°C seemed to be a more favorable temperature regime than 8°C/2°C. In general, soluble sugar contents in roots were higher than in shoots. After 8 days at 12°C/12°C (EXP2-PAcc8) following nursery, F83.005-5 showed higher root contents of fructose and glucose than DZA.045-5, unlike sucrose which content was higher in shoots of DZA.045-5 than in those of F83.005-5, while no difference was detected in roots. After the acclimation period (EXP2-Acc14), compared to N15, sucrose showed a more significant increase both in shoots and roots and for both lines. At the three sampling stages, temperature had a lesser effect on glucose content. Despite those differences in root and shoot sugar contents, there were little differences between the two lines when considering the total soluble sugar content at each stage (Fig. 5B).





**Figure 5.** a: Fructose, glucose and sucrose contents in shoots (S) and roots (R) of F83.005-5 and DZA.045-5 at 15 days of Nursery (N15), 8 days of Pre-Acclimation (PAcc8) and 14 days of Acclimation (Acc14) phases during EXP2. b: Cumulated fructose, glucose and sucrose contents in whole plants of both lines at the N15, PAcc8 and Acc14 stages. The contents are expressed relatively to shoot and root dry weights.

#### *Genetic linkage map and QTL mapping*

The genetic linkage map of the LR3 population comprised a total of 178 markers, including 107 SSR, 57 AFLP, 12 RAPD and 2 EST-CAPS, distributed over 8 linkage groups (LG, Fig.

6). The linkage map covered 1197 cM Kosambi. Thirty-six SSR markers were common with the *M. truncatula* genetic map generated from the Jemalong-6 x DZA.315-16 F6-RIL population, namely LR4 (Huguet, 2004; Julier *et al.*, 2007). Thirty-one SSR markers were anchored to sequenced BACs and 25 were common to the integrated genetic-physical map (<http://www.medicago.org/genome/map.php>, Univ. Minn. 2006; Mun *et al.*, 2006). Order conservation of these 25 common markers between the present genetic map and the reference *M. truncatula* genetic and physical maps was very high. Based on these common markers well distributed on the genome, few genomic regions remained with a poor marker-coverage. Mainly, a large interval between two markers was still observed at the middle region on LG8. Among the 178 markers mapped, 65 markers (36 %) did not segregate according to expected Mendelian ratios, tested by chi-square analysis at  $\alpha=1\%$ , including 13 AFLPs, 2 RAPDs and 50 SSRs. Out of these 65 markers, 11 favored a higher F83.005-5 allele frequency and 54 favored the DZA.045-5 alleles.

All traits studied showed a normal Gaussian distribution in the RILs population (Fig. 7), except FDS2W and ElecLeak. For both these traits, the distribution of the RILs was shifted towards the mean value of DZA.045-5, the susceptible parental line. The heritability values of the traits (Table 2) ranged from 0.132 to 0.891 with the highest values for CCI (0.607), FDS2W (0.634) and ElecLeak (0.891).

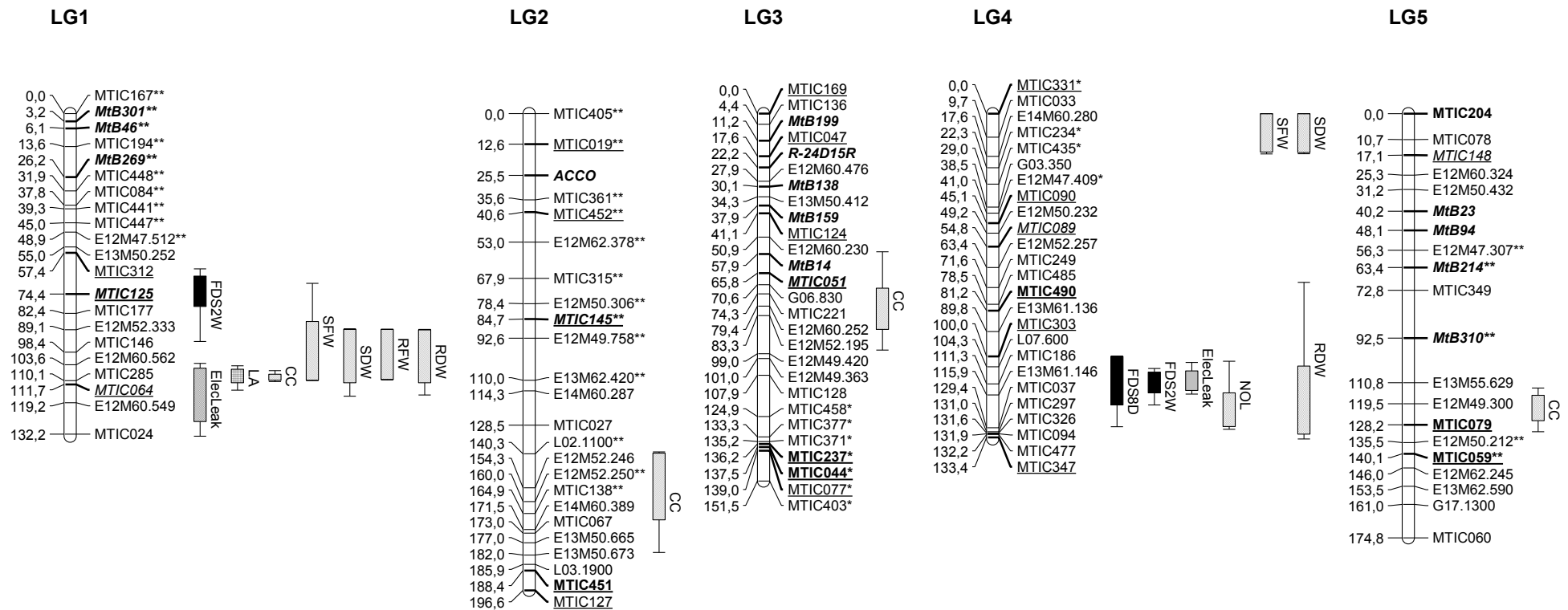
**Table 2.** Broad-sense heritabilities ( $h^2$ ) for traits mapped in the *M. truncatula* LR3 population with their standard errors. Traits names are described in the legend of Fig. 6.

Trait	$h^2$	STD Error
FDS2W	0.634	0.055
ElecLeak	0.891	0.012
NOL	0.512	0.067
LA	0.449	0.075
CCI	0.607	0.054
SFW	0.410	0.080
SDW	0.383	0.083
RFW	0.524	0.065
RDW	0.268	0.010
SDW/RDW	0.132	0.013

The QTL detected by the CIM procedure are presented in Fig. 6 and Table 3. Most of them lied on three linkage groups (LG1, LG4 and LG6). One linkage group (LG8) had no QTL and only one QTL was observed on linkage groups LG2, LG3, LG5 and LG7.

#### *QTL on LG6*

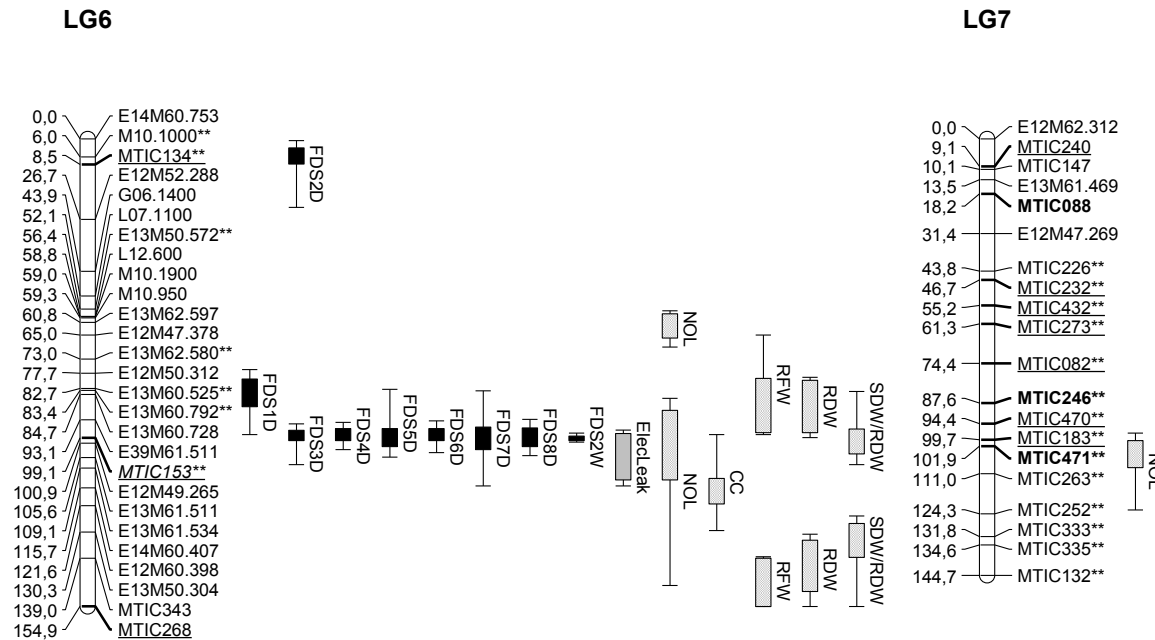
*QTL for freezing damage score:* QTL for freezing damage score (FDS) were detected mostly on LG6. FDS after 1 to 8 days of freezing (FDS1D to FDS8D) were considered to check the potential effect of the duration of freezing on QTL detection. FDS1D-8D QTL explained 6.0 to 16.5% of the observed variation and were mainly grouped on LG6. FDS2W QTL, the most important one, with a relatively high  $R^2$  (40%) on LG6 confirmed that the best period to screen the RILs population of *M. truncatula* for freezing damage is after two weeks of rewarming. Furthermore, the high heritability value of FDS2W (0.634) confirmed that this trait is appropriate to select freezing tolerant lines. All the FDS QTL had a negative value of the additive effect for F83.005-5, indicating that the F83.005-5 allele contributed to increase freezing tolerance and is thus a favorable allele for this trait.



**Figure 6.** *M. truncatula* genetic map and QTL, established from a population of 178 F5 RILs, namely LR3, derived from the cross between F83.005-5 and DZA.045-5. Markers names are indicated on the right of each linkage group (LG). Markers positions are indicated in cM Kosambi on the left on each LG. Underlined markers are common to the LR4 genetic map (Huguet, 2004; Julier et al., 2007). Markers in bold are anchored to sequenced BACs, markers in italic are common to the integrated reference genetic-physical map of *M. truncatula* (<http://www.medicago.org/genome/map.php>; Mun et al., 2006). Markers in segregation distortion ( $\alpha=1\%$ ) are indicated by one asterisk when F83.005-5 alleles are favored and by two asterisks when DZA.045-5 alleles are favored. The confidence interval of QTL position was estimated as the interval between positions where the LOD value decreased respectively by 1 and 2 units, relatively to that of the most likely position.

Traits names are as followed: FDS2W for freezing damage score after 2 weeks of rewarming, FDS1D to FDS8D for freezing damage score after 1 to 8 days under freezing conditions, ElecLeak for electrolyte leakage in leaves after 2 weeks of rewarming, CCI for chlorophyll content index, NOL and LA for number of leaves and leaf area per plant before entering the freezing phase, SFW SDW RFW and RDW for shoot fresh weight, shoot dry weight, root fresh weight and root dry weight, respectively.

Figure 6 (continued)



**Table 3.** QTL parameters in the *M. truncatula* LR3 population. Traits meanings are as follow: CCI for chlorophyll content index, ElecLeak for electrolyte leakage, FDS2W for freezing damage score after 2 weeks under rewarming conditions, FDS1D to FDS8D for freezing damage score after 1 to 8 days of freezing, SFW for shoot fresh weight per plant, SDW for shoot dry weight per plant, RFW for root fresh weight per plant, RDW for root dry weight per plant, NOL for number of leaves per plant and LA for leaf area per plant.

LG	Trait	QTL peak position (cM)	LOD	Confidence interval (cM) (LOD-2)-(LOD-1)-(LOD+1)-(LOD+2)	R <sup>2</sup>	Additive effect of line F 83.005-5	Nearest marker
1	CC	110	11.0	106-107.5--110-110.5	20	3.2	MTIC285
	ElecLeak	117.6	2.7	103-105--127-133	5.5	-5.6	E12M60.549
	FDS2W	73.4	5.3	64-67--79.5-94	9	-0.2	MTIC125
	SFW	109.5	3.3	70-85.7--110-110.1	8	0.1	MTIC285
	RFW	89	7.6	88.9-89--109.6-109.8	17	0.1	E12M52.333
	SDW	110	3.1	88.8-89--111-116.5	7.4	0.02	MTIC285
	RDW	110	4.0	89-89.2--111-116	8.5	0.01	MTIC285
	LA	109.6	6.2	104-105.4--111-114	15.2	1.9	MTIC285
2	CCI	164.9	3.8	139.5-140--167.5-181	6	-1.6	MTIC138
3	CCI	74.3	3.2	57-72--89-97.5	5	1.4	MTIC221
4	ElecLeak	111	3.4	102.5-106--114-115.5	6.1	-7.0	MTIC186
	FDS2W	111	6.4	105-106.5--115-120	9	-0.2	MTIC186
	FDS8D	104	2.8	100-100--120-129	6	-0.1	L07.600
	SFW	0	3.6	0-0--15.8-16.6	9	-0.1	MTIC331
	SDW	0	3.6	0-0--16-16.5	9	-0.02	MTIC331
	RDW	119.9	3.4	69.5-104--132-134	7.5	0.01	E13M61.146
	NOL	121.9	4.7	102-115--128.9-130	11.2	0.7	E13M61.146
5	CCI	121.5	5.0	113-116--126.5-131	8.2	1.9	E12M49.300
6	CCI	115.7	3.0	98-112.5--121-129.8	5	1.4	E14M60.407
	ElecLeak	99	10.0	96.5-97.7--113-115	18	-10.6	MTIC153
	FDS2W	99	23.0	97.5-98.5--100-105.5	40	-0.4	MTIC153
	FDS1D	83	3.9	76.5-79.6--88.8-98	8	-0.1	E13M60.792
	FDS2D	6	3.7	0.6-3--8.3.8-22.7	6.3	-0.1	M10.1000
	FDS3D	99	7.1	94.5-96.6--100-108	16.5	-0.2	MTIC153
	FDS4D	99	6.8	94-96--100-103	14	-0.2	MTIC153
	FDS5D	99	6.0	83-96--102-105.5	13.5	-0.2	MTIC153
	FDS6D	99	7.0	93.5-96--100-104	14	-0.2	MTIC153
	FDS7D	99	5.3	83.5-95.5--103-115	12	-0.1	MTIC153
	FDS8D	99	6.7	93-95.8--102-105	13.5	-0.2	MTIC153
	RFW	82.7	3.2	65-79.4--97.4-98	7.1	0.1	E13M60.525
	RFW	147	3.4	138.5-139--155-155	10.5	-0.1	MTIC343
	SDW/RDW	99	4.3	83.7-96.2--104.4-108	9.4	-0.6	MTIC153
	SDW/RDW	132.3	4.7	125-127.5--138.7-155	11.4	0.6	E13M50.304
	RDW	92.7	4.4	79-80--97.4-99	9.4	0.01	E39M61.511
RDW	143	5.0	131-133--150-155	13.3	-0.01	MTIC343	
NOL	59.3	3.1	57-58--66-69	5.5	-0.7	M10.950	
NOL	99	3.0	86-90--113-148	6.1	0.9	MTIC153	
7	NOL	103.9	3.5	97.5-100--109-123	7.5	0.6	MTIC471

*QTL for other physiological traits:* The ElecLeak QTL on LG6 explained 18% of the observed variation. The additive effects showed that F83.005-5 alleles were favorable for this trait (Table 3). A QTL for Chlorophyll Content Index (CCI) was detected on LG6, with  $R^2 = 5\%$  and a positive F83.005-5 additive effect. Some biomass traits QTL (RFW, RDW and SDW/RDW) were detected on LG6 in two locations with opposite additive effects in each case. There were also two QTL for NOL on LG6 with opposite F83.005-5 additive effects. No shoot fresh weight QTL was detected on LG6. On LG6, the colocalization observed between most of the detected QTL can partly be explained by the high significant correlation coefficients reported between the corresponding traits (Table 4 and Table 5).

#### *QTL on LG1 and LG4*

Other QTL for FDS2W were detected on LG1 and LG4 with  $R^2$  of 9% each and a QTL for FDS8D was detected on LG4. Two QTL for ElecLeak were detected with  $R^2 = 5.5\%$  on LG1 and  $R^2 = 6.1\%$  on LG4. A single QTL for LA was detected on LG1 with  $R^2 = 15.2\%$ . On LG1, another QTL for CCI was detected with  $R^2 = 20\%$ . These QTL colocalized with some biomass QTL (NOL and RDW on LG4; SFW, SDW, RFW and RDW on LG1). However there was no colocalization between FDS2W and ElecLeak on LG1.

#### *Minor QTL*

Three other QTL for CCI were detected on LG2 ( $R^2 = 6\%$ ), LG3 ( $R^2 = 5\%$ ) and LG5 ( $R^2 = 8.2\%$ ) and a QTL for NOL ( $R^2 = 7.5\%$ ) was detected on LG7.

No QTL were detected for LWC and RWC although these traits showed a quantitative variation among the LR3 lines (Fig. 7).

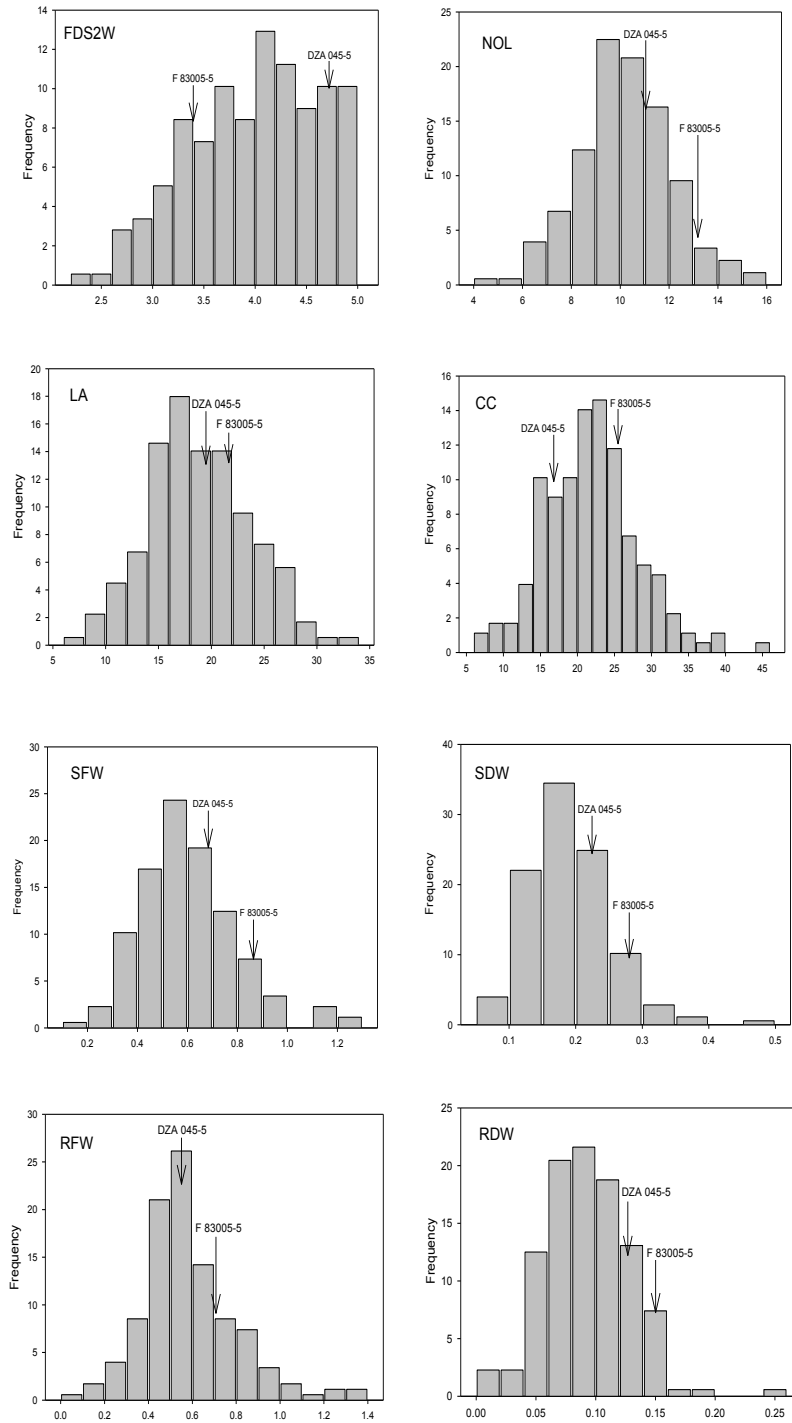
**Table 4.** Correlation coefficients (top lines) and associated P values (bottom lines) calculated between each pair of the different traits analyzed in the *M. truncatula* LR3 population. Traits names are described in the legend of Fig. 6.

Trait	ElecLeak	NOL	LA	CCI	SFW	SDW	RFW	RDW	LWC	RWC	SDW/RDW
FDS2W	0.646 <.0001	-0.099 0.189	-0.062 0.408	-0.290 <.0001	-0.028 0.711	-0.077 0.306	-0.218 0.004	-0.125 0.099	0.226 0.003	-0.026 0.734	0.180 0.017
ElecLeak		-0.082 0.277	-0.065 0.393	-0.252 0.001	-0.051 0.501	-0.069 0.364	-0.167 0.027	-0.067 0.380	0.092 0.228	-0.106 0.163	0.100 0.186
NOL			0.775 <.0001	0.384 <.0001	0.618 <.0001	0.603 <.0001	0.430 <.0001	0.419 <.0001	0.003 0.969	0.101 0.181	-0.172 0.023
LA				0.554 <.0001	0.732 <.0001	0.721 <.0001	0.588 <.0001	0.486 <.0001	-0.052 0.499	0.178 0.018	-0.196 0.009
CC					0.480 <.0001	0.552 <.0001	0.485 <.0001	0.394 <.0001	-0.289 0.000	0.116 0.124	-0.176 0.019
SFW						0.942 <.0001	0.726 <.0001	0.622 <.0001	-0.009 0.911	0.123 0.103	-0.157 0.038
SDW							0.719 <.0001	0.741 <.0001	-0.262 0.001	0.018 0.815	-0.212 0.005
RFW								0.717 <.0001	-0.107 0.162	0.180 0.017	-0.369 <.0001
RDW									-0.402 <.0001	-0.303 <.0001	-0.558 <.0001
LWC										0.437 <.0001	0.293 <.0001
RWC											0.312 <.0001

**Table 5.** Correlation coefficients (top lines) and associated P values (bottom lines) calculated between ElecLeak evaluated after two weeks of rewarming on the one hand and FDS evaluated after 1 to 8 days of the freezing phase of EXP2 (FDS1D to FDS8D, respectively) or after two weeks of rewarming (FDS2W) on the other hand. Traits names are described in the legend of Fig. 6.

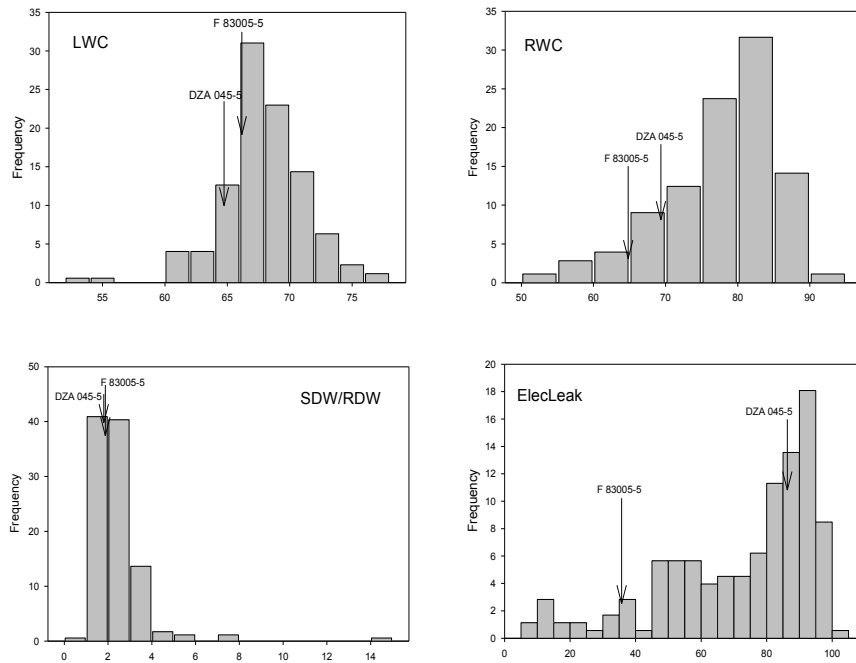
Trait	FDS1D	FDS2D	FDS3D	FDS4D	FDS5D	FDS6D	FDS7D	FDS8D	FDS2W
ElecLeak	0.395 <.0001	0.413 <.0001	0.497 <.0001	0.527 <.0001	0.534 <.0001	0.565 <.0001	0.562 <.0001	0.579 <.0001	0.646 <.0001





**Figure 7.** Distribution of quantitative traits in the *M. truncatula* LR3 population. Mean values of both parents are indicated by arrows. LWC for leaf water content and RWC for root water content. Other trait names are described in the legend of Fig. 6.

Figure 7 (continued)



## Discussion

### *Genetic variability for freezing tolerance in M. truncatula*

The objectives of EXP1 were different from EXP2 and EXP3 which explains the differences between the experimental conditions. EXP1 was designed to evaluate the extent of the freezing tolerance variability among a set of 15 accessions of *M. truncatula* in order to compare this species to other legumes and to freezing tolerant species. EXP1 is then to be considered as an additional experiment, out of the initial design of EXP2 and EXP3. However if an absolute comparison is difficult between the  $LT_{50}$  evaluation (EXP1) and the freezing damage score (EXP2), general tendencies are to be considered, especially when comparing the ranking of the different accessions between both experiments.

Among the 15 *M. truncatula* accessions firstly subjected to pre-acclimation (12/12°C) for 5 days then to acclimation (8/2°C) for 10 days, the  $LT_{50}$  values ranged from -2.5 to -7°C. This confirms that *M. truncatula* is a species exhibiting a relatively poor freezing tolerance, as already shown by Hekneby *et al.* (2006) for cv. Paraggio ( $LT_{50} = -7.8^{\circ}\text{C}$ ), by Brandsaeter *et al.* (2002) for cv. Parabinga ( $LT_{50} = -5.3^{\circ}\text{C}$ ) or by Pennycooke *et al.* (2008) for the line Jemalong A17 ( $LT_{50} = -4.0^{\circ}\text{C}$ ). Comparatively,  $LT_{50}$  assayed in cereals like winter rye for

example is lower than  $-20^{\circ}\text{C}$  (Webb *et al.*, 1994). When compared to other annual legumes *M. truncatula* also shows the poorest freezing tolerance. A slight difference was found between the four annual legumes experimented by Hekneby *et al.* (2006), where *M. truncatula* cv. Paraggio and *Trifolium subterraneum* L. spp. *Brachycalicynum* cv Clare showed a lower level of freezing tolerance associated to a  $\text{LT}_{50}$  value of  $-7.8^{\circ}\text{C}$  comparatively to *Trifolium michelianum* Savi cv. Giorgia and *Medicago polymorpha* L. cv. Anglona which exhibited a  $\text{LT}_{50}$  value of  $-8.8^{\circ}\text{C}$ . Recently, Pennycooke *et al.* (2008) when comparing *M. truncatula* and *M. sativa* subsp. *falcata* found that *M. truncatula* survived to about  $-4^{\circ}\text{C}$  after acclimation, while *M. sativa* subsp. *falcata* survived to nearly  $-14^{\circ}\text{C}$  in the same conditions. The best level of freezing tolerance recorded in the present experiment is in agreement with the figures already published for this species and the  $\text{LT}_{50}$  value evaluated for Jemalong A17 is equal to the one observed by Pennycooke *et al.* (2008) for the same cultivar. In addition, the results obtained for 15 accessions of diverse geographical origins point out a relatively large genetic variability in the *M. truncatula* response to negative temperatures after a cold acclimation phase, with some lines exhibiting lower freezing tolerance than previously described, such as Algerian lines and ESP.096-A with  $\text{LT}_{50}$  value around  $-2.5^{\circ}\text{C}$ .

The results presented here demonstrate a good relationship between the geographic origin of the accessions and their freezing tolerance. The accessions from lower latitudes (Algeria, Southern Spain, Syria) were shown to be more freezing susceptible than those from France. However, no clear relationship was found between freezing tolerance and the altitude of the area of origin, which is illustrated by the fact that both high and low collection sites were represented for susceptible lines (DZA.233-4 and DZA.045-6, respectively). The present results are in agreement with previous investigations in saltgrass, which showed that freezing tolerance is inherited and highly influenced by climatic areas of origin (Nakayama *et al.*, 1997; Rukavina *et al.*, 2007).

Although it would have been interesting to study a segregating population from a cross showing a wider phenotypic variation for the freezing tolerance traits, for instance between F20.026 or F11.005-E and DZA.045-5, our results support the choice of the available LR3 population, derived from F83.005-5 and DZA.045-5, since these two lines belong to statistically different groups of  $\text{LT}_{50}$  and show variation for FDS traits that allowed to identify QTL.

*Characterization of the parental lines subjected to different temperature regimes**Rubisco activity, chlorophyll content and soluble sugars*

Rubisco activity and activation have been assayed in the two parental lines, subjected to different temperature regimes. Results showed that, reducing temperature down to 8/2°C (day/night) increased both initial and total activities of the two lines to a level at least equal to that observed under warm growing conditions. This is in accordance with previous results showing that in herbaceous species like wheat, rye and *Arabidopsis thaliana*, upon temperature decrease, after a first period where Rubisco activity decreases, the enzyme recovers its normal level to maintain the capacity for active photosynthesis during prolonged exposure to low non freezing temperatures, with no change in photosynthetic efficiency (Huner *et al.*, 1998). Furthermore, as shown for spinach (Holaday *et al.*, 1992), light activation of enzymes such as Rubisco may act as a temperature-compensating mechanism in leaves exposed to low temperature. Acclimation to low temperatures involves an increase in the photosynthetic capacity and thus requires an increase in the activity of key enzymes such as Rubisco which might otherwise limit the rate of photosynthesis at lower temperature (Holaday *et al.*, 1992).

When the two lines were compared to each other, results appeared more questioning. While Rubisco activation results seemed to be in accordance with what could be expected, i.e. F83.005-5 (tolerant) had a higher Rubisco activation than DZA.045-5 (sensitive) when submitted to pre-acclimation (12/12°C) and cold acclimation (8/2°C) regimes, initial and total activities varied in the opposite direction. Especially under the 12/12°C temperature regime, where Rubisco initial activity decreased for both lines and total activity decreased for F83.005-5, we recorded an important difference between both lines. The reasons why DZA.045-5, the sensitive line had higher Rubisco initial and total activities when temperature decreased remain unclear.

Reducing temperature further below 12°C had a negative impact on the chlorophyll content, especially for DZA.045-5. This kind of reduction in chlorophyll content after a temperature decrease has been reported in other species such as rice or soybean (Wang *et al.*, 2006; Al-Shoaibi, 2007; Yadegari *et al.*, 2007).

Soluble sugars have long been described as important factors limiting freezing injuries by playing a protective role in the cells, maintaining as much as possible their integrity (Olien and Clark, 1993; Xin and Browse, 2000). Our data indicate that under the 12/12°C temperature regime, fructose, glucose and sucrose concentrations increased highly, especially in roots, and significant differences advantaging F83.005-5 were detected for fructose and

glucose. Results also showed that little differences were observed when considering the total sugar content in whole plants at each stage. Therefore, more than the total sugar content, its distribution between shoot and root seems to be the most important characteristic during cold acclimation in *M. truncatula*. The level of sugar content in roots before freezing period is more decisive. Labate and Leegood (1988) reported that concomitantly to carbohydrates accumulation after transfer to low temperature, the rate at which sucrose for example is synthesized could limit the rate of photosynthesis. This is consistent with the low Rubisco activity observed at 12/12°C while sugars contents increased highly. These higher contents of sugars were not maintained under the 8/2°C temperature regime applied before the freezing period. We know that cold acclimation and freezing stress involve very complex factors and regarding soluble solutes, even if their cryoprotective role has been long described, their relationship with freezing tolerance is not yet clearly elucidated (Annicchiarico *et al.*, 2001). However, such results raise the question about efficient temperatures for cold acclimation. Concerning sugars concentration, 12/12°C would be a better acclimation regime than 8/2°C, because the high sugar contents accumulated at 12/12°C would better prevent plants from freezing injury in the following freezing phase. Nevertheless, for Rubisco activity, the 8/2°C temperature regime appeared to be more efficient, while 12°C was also better for CCI. The importance of the temperature of acclimation has also been highlighted by Crosatti *et al.* (2008) who showed that in barley, COR14b protein accumulation was correlated with frost tolerance for plants grown at 11/7°C while no correlation was found for plants grown at 3/1°C.

#### *Genetic linkage map and QTL for freezing tolerance in M. truncatula*

The linkage map of LR3 covers 1197 cM Kosambi, which is higher than the size of genetic maps previously established from A17 x A20 F2 populations (513 cM in Choi *et al.*, 2004a; 566 cM in Mun *et al.*, 2006). But this is consistent with genetic map lengths previously reported from Jemalong-6 x DZA.315-16 F2 or F6-RIL populations (1225 cM and 1097 cM in Thoquet *et al.* (2002) and Huguet (2004), respectively). Sixty-five markers (36%) were found to not segregate according to expected Mendelian segregation ratios. This value of 36% distorted marker segregation is similar to the 25% distorted segregation reported by Thoquet *et al.* (2002) and 32% reported by Choi *et al.* (2004a). Markers showing segregation distortion were distributed in clusters favoring DZA.045-5 alleles on LG1, LG2, LG5, LG6, LG7 and LG8, and favoring F83.005-5 alleles on LG3 and LG4, suggesting possible selection events in the RILs construction process.

*QTL for freezing tolerance in M. truncatula*

Results showed that freezing tolerance in *M. truncatula* is controlled by a reduced number of QTL on LG1, LG4 and LG6. QTL for physiological traits such as ElecLeak, CCI or root and shoot weights colocalized with QTL for FDS, especially on LG6 where the FDS2W QTL explained 40% of the observed variation.

In the correlation matrix (Table 4) no significant correlation was found between leaf area (LA) on the one hand and FDS2W or ElecLeak on the other hand. Nevertheless, QTL mapping results showed QTL for NOL or LA colocalizing with FDS2W or ElecLeak on LG1, LG4 and LG6. Furthermore, based on their additive effect, it appeared that the favorable alleles at these loci were almost always brought by the tolerant parental line. In cereals such as wheat, Limin and Fowler (2002) and Mahfoozi *et al.* (2006) reported that an increase in leaf number was associated to a higher freezing tolerance. Because it is related to the length of the vegetative stage, NOL is one of the factors that influence the duration of the expression of freezing tolerance genes. In legume species, some forage lines of pea for example delay their floral initiation to escape winter freezing periods (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999) and in their experiments on freezing tolerance of different annual and biennial legumes, Brandsaeter *et al.* (2002) found that species that reached flowering stage before freezing showed poor freezing resistance.

On LG6 many QTL colocalized together, with their peak LOD values at 99 cM, on the marker MTIC153. This included the most important QTL (FDS2W) with a  $R^2$  of 40% within a LOD-1 confidence interval of 1.5 cM and LOD-2 interval of 3 cM, i.e. this QTL located in a relatively small zone. This confers an important role to the LG6 in the variation of freezing tolerance among the LR3 population. The colocalization of FDS2W and ElecLeak on LG4 and LG6 is an important result confirming the importance of the chromosomal regions involved. All traits that were significantly correlated colocalized on at least one of these both positions.

The distribution of the RILs for FDS2W was not normal, contrary to most of the traits studied. This distribution was shifted towards the mean value of DZA.045-5 the susceptible parent. The shift might be explained by the fact that no difference could be made between the plants that were killed by the stress, all of them having been scored 5.

Leakage of ions, evaluated by the conductivity test is a common phenomenon of freezing injury and its measure is used to estimate freezing injury in plants (Dexter *et al.*, 1930; Levitt,

1980). The most susceptible parent experimented here, DZA.045-5, had an electrolyte leakage value of 87% after 2 weeks of rewarming while the value for the tolerant parent F83.005-5 was 36%. Plant cells have the ability to repair damage depending upon the degree of injury (Palta and Paul, 1980). Some RILs of the LR3 population, as well as the parental tolerant line F83.005-5, were probably able to repair efficiently damages to their membranes while most of them (like the susceptible line DZA.045-5) lacked this ability. Furthermore, such a distribution of the ElecLeak trait suggests that this trait should be controlled by a major gene, which is also supported by the fact that only 3 QTL were detected for this trait, one of them on LG6 having a higher coefficient of explanation of the observed variability.

While a relatively normal distribution was found within the recombinant inbred lines for leaf and root water content, no significant QTL was detected for these traits, and despite a significant correlation between LWC and FDS2W. However, QTL for water content were detected in association with freezing tolerance in *Brassica napus* (alleles increasing the crown water content came from both the tolerant and the susceptible parental lines; Asghari *et al.*, 2007) and related to drought resistance in barley (Teulat *et al.*, 2003) or in interaction with nitrogen availability in *Arabidopsis thaliana* (Loudet *et al.*, 2003) for example.

The traits frequency distributions showed that in many cases, there was little difference between both parents of the RILs. Despite this, frequency distributions of the measured traits showed that transgressive individuals were found in the population and related QTL were detected (except for LWC and RWC). Other studies such as that of Calenge *et al.* (2006) on natural variation for carbohydrate content in *Arabidopsis thaliana* also reported QTL detection despite close traits values for the parental lines.

In summary, three main LG were highlighted by the present results of QTL mapping. Among them, LG6 was the most interesting for it gathered several QTL among which the most explanatory ones. *M. truncatula* LG6 is a particular LG as it appeared to be the shortest one, according to the physical map data (<http://www.medicago.org/genome/map.php>), the most heterochromatic (Kulikova *et al.*, 2001) and with the highest number of resistance gene analog (RGA) genes (Choi *et al.*, 2004a). These observations may influence candidate genes detection related to freezing tolerance on this LG. Many of the QTL mapped on LG6 were located at a peak position on the marker MTIC153. It would be further interesting to map other anchored markers in the QTL intervals in order to propose a list of candidate genes. A few works about freezing tolerance have used QTL based candidate genes method to localize important genes involved in this stress tolerance. For example, in *Arabidopsis thaliana*, Alonso-Blanco *et al.* (2005) found on chromosome 4 that the most explanatory freezing

tolerance QTL with  $R^2$  ranging from 19.5 to 24.0 % was related to *CBF* genes and especially *CBF2*; Baga *et al.* (2007) found in winter-wheat an important low-temperature QTL with 40% of explained variance on chromosome 5A, that was associated to two *CBF* genes mapped to the *Fr-2* locus. This kind of results can be used for breeding purpose in agronomic important crops by choosing linked markers for efficient selection.

#### *Potential for the understanding of freezing tolerance in cultivated legumes*

Using a pea F8 RIL population derived from Champagne x Terese, Lejeune-Hénaut *et al.* (2008) recently reported 6 distinct winter frost damages (WFD) QTL among which WFD 3.1 (on LG3) and WFD 6.1 (on LG6) were very consistently detected in different environmental conditions. The importance of LG6 shown in *M. truncatula* compared to QTL detection results in pea seems very interesting while considering the high level of synteny between pea and *M. truncatula*, that should allow transfer of information collected in the model plant to the pea crop. Choi *et al.* (2004) and Aubert *et al.* (2006) showed a high level of conservation between pea LG6 and *M. truncatula* LG6. Perspectives of this study are then to use QTL mapping results as a basis towards a search of candidate genes regulating freezing tolerance in *M. truncatula* in a first step, and subsequently in pea.

### **Supplemental Material**

Two tables giving information about new genetic markers used in this study are available as supplemental data (Table S1 and Table S2).



**Table S1** AFLP primer combinations employed to generate fingerprints<sup>a</sup> E indicates *EcoRI* primer 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C+ANN-3'<sup>b</sup> M indicates *MseI* primer 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+CNN-3'<sup>c</sup> In brackets, code names of *EcoRI/MseI* primer combinations used in Thoquet et al. (2002).

	E-AC <sup>a</sup>	E-AG	E-AT	E-AGA
M-CAA <sup>b</sup>	E12M47	E13M47 (PB)	E14M47	E39M47
M-CAC	E12M48 (PI <sup>c</sup> )	E13M48 (PA)	E14M48 (PD)	E39M48
M-CAG	E12M49	E13M49	E14M49 (PE)	E39M49
M-CAT	E12M50 (PK)	E13M50 (PC)	E14M50	E39M50
M-CCA	E12M51	E13M51	<i>E14M51</i>	E39M51 (PG)
M-CCC	E12M52	E13M52	E14M52	E39M52
M-CCG	E12M53	E13M53	E14M53	E39M53
M-CCT	E12M54	E13M54	E14M54	E39M54
M-CGA	E12M55	E13M55	E14M55	E39M55
M-CGC	E12M56	E13M56	E14M56	E39M56
M-CGG	E12M57	E13M57 (PM)	E14M57	E39M57
M-CGT	<i>E12M58</i>	E13M58	E14M58	E39M58 (PF)
M-CTA	E12M59	E13M59 (PL)	E14M59	E39M59
M-CTC	E12M60	E13M60	E14M60	E39M60
M-CTG	E12M61 (PH)	E13M61	E14M61	E39M61
M-CTT	E12M62 (PJ)	E13M62	E14M62	E39M62

**Table S2** Additional *Medicago truncatula* EST microsatellite primers used in this study (Huguet, unpublished): primer sequences, linkage group in *M. truncatula*, Genbank EST ID and repetitive motif.

N° MTIC	Primers (5'-3')		Linkage group	MtB_EST	Repetitive motif
	Forward	Reverse			
MTIC6	CACAGTACTGCCACCGTCAA	GTCGGAGGTGAGAGGTTGAA	8	MtBA25G04F1	[AAC]5
MTIC132	TTCCACCTTGACCACTGTTG	CCCCAAATTTACACAGATCTTCA	7	MtBC03G06R1	[AG]7
MTIC167	TGTTGTTCCAAAATTTGTCTCC	TGAAAAAGTGGGGTCTGTTT	1	MtBA07D05F1	[TC]7
MTIC186	TGGTGCTGGAAAGAAGAAGG	CACAGAGCTTCCAAAGTTGC	4	MtBA21H11F1	[AG]9
MTIC263	AATCAAACCAATCATCACC	GTGTTCCCCAGTTCTCAGT	7	MtBB27H08F1	[CAT]6
MTIC315	CATTTCTTCATTCTTGACACA	GGCTTGAACCACAAAAGATA	2	MtBA24G01F1	[TTC]9
MTIC377	AACCCTTCCTTCCTTCCAAA	GCCATTGTTGATTGGGTTTT	3	MtBA03D10F1	[TC]6
MTIC435	TGGTGAGATAGAGGGAAGTG	ATCGAACAACAACCTTTCACA	4	MtBA09A02F1	[TC]5
MTIC458	GAGTACTTCAATTCCCATGC	CACAGGATCACTCAGTAGCA	3	MtBC18H02R1	[GT]5
MTIC477	TGAGATCAGTGTGCCATAGA	TACTTCTCCTCCGGCAAA	4	MtBB33C11F1	[GAA]5
MTIC485	CTCTACACTCATTGCCCTTCTC	AAGAATGCCTATGAATGTGAAAC	4	MtBA28C04F1	[TC]10

## Acknowledgements

We are very grateful to M. Delalande from INRA center of Mauguio (Montpellier, France) for kindly providing seeds of the *M. truncatula* LR3 population. We are also grateful to F. Depta, J-F. Hu, B. Decaux, R. Devaux, M. Boilleau, O. Jaminon, A-S. Niquet, K. Lourgant, A. Ketele, G. Deniot and I. Le Goff for either their technical support for devices used or great help for periodical sampling. This work was supported by the Picardie region and by the UNIP (Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes Riches en Protéines). The development of the F83.005-5 x DZA.045-5 genetic map was supported within the EU-FP6 GLIP project.

## References

- Al-Shoaibi AA.** 2007. Growth response of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and *Zea mays* to chilling temperature. *Biosciences Biotechnology Research Asia* **4**, 389-394.
- Alonso-Blanco C, Gomez-Mena C, Llorente F, Koornneef M, Salinas J, Martinez-Zapater JM.** 2005. Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**, 1304-1312.
- Annicchiarico P, Collins RP, Fornasier F, Rhodes I.** 2001. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. *Euphytica* **122**, 407-416.
- Asghari A, Mohammadi SA, Moghaddam M, Mohammaddoost HR.** 2007. QTL analysis for cold resistance-related traits in *Brassica napus* using RAPD markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **5**, 188-192.
- Aubert G, Morin J, Jacquin F, Loridon K, Quillet MC, Petit A, Rameau C, Lejeune-Henaut I, Huguet T, Burstin J.** 2006. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 1024-1041.
- Baga M, Chodaparambil SV, Limin AE, Pecar M, Fowler DB, Chibbar RN.** 2007. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Functional and Integrative Genomics* **7**, 53-68.
- Biber PD.** 2007. Evaluating a Chlorophyll Content Meter on Three Coastal Wetland Plant Species. *Journal of Agriculture, Food, and Environmental Sciences* **1**, 1-11.
- 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.
- Brandsaeter LO, Olsmo A, Tronsmo AM, Fykse H.** 2002. Freezing resistance of winter annual and biennial legumes at different developmental stages. *Crop Science* **42**, 437-443.
- Brouwer DJ, Duke SH, Osborn TC.** 2000. Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa. *Crop Science* **40**, 1387-1396.
- Calenge F, Saliba-Colombani V, Mahieu S, Loudet O, Daniel-Vedele F, Krapp A.** 2006. Natural variation for carbohydrate content in Arabidopsis. Interaction with complex traits dissected by quantitative genetics. *Plant Physiology* **141**: 1630-1643.
- Chen THH, Gusta LV, Fowler DB.** 1983. Freezing injury and root development in winter cereals. *Plant Physiology* **73**, 773-777.
- Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK.** 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Science* **12**, 444-451.

- Choi HK, Kim DJ, Uhm TS, Limpens E, Lim HJ, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR.** 2004a. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**, 1463-1502.
- Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu HY, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR.** 2004b. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 15289-15294.
- Crosatti C, Pagani D, Cattivelli L, Stanca AM, Rizza F.** 2008. Effects of growth stage and hardening conditions on the association between frost resistance and the expression of the cold-induced protein COR14b in barley. *Environmental and Experimental Botany* **62**, 93-100.
- Dexter ST, Tottingham WE, Graber LF.** 1930. Preliminary results in measuring the hardiness of plants. *Plant Physiology* **5**, 215-223.
- Doyle JJ, Doyle JL.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Toth B, Hayes PM, Skinner JS, Pecchioni N.** 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 670-680.
- Gutierrez MV, Patto MCV, Huguet T, Cubero JI, Moreno MT, Torres AM.** 2005. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 1210-1217.
- Hecht V, Foucher F, Ferrandiz C, Macknight R, Navarro C, Morin J, Vardy ME, Ellis N, Beltran JP, Rameau C, Weller JL.** 2005. Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiology* **137**, 1420-1434.
- Hekneby M, Antolin MC, Sanchez-Diaz M.** 2001. Cold response of annual Mediterranean pasture legumes. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*, 157-161.
- Hekneby M, Antolin MC, Sanchez-Diaz M.** 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental Botany* **55**, 305-314.
- Holaday AS, Martindale W, Alred R, Brooks AL, Leegood RC.** 1992. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiology* **98**, 1105-1114.
- Holland JB, Nyquist WE, Cervantes-Martínez CT.** 2003. Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. *Plant Breeding Reviews* **22**, 9-111.
- Huguet T.** 2004. Genetic map of the *Medicago truncatula* LR4 population. [http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/GeneticMAP/LR4\\_MAP.html](http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/GeneticMAP/LR4_MAP.html) LIPM, Toulouse, France.

- Huner NPA, Oquist G, Sarhan F.** 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Science* **3**, 224-230.
- Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T, Huyghe C.** 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology* **3**, 9.
- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre JB, Prospero JM, Barre P, Huyghe C.** 2007. Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 1391-1406.
- Kahraman A, Kusmenoglu I, Aydin N, Aydogan A, Erskine W, Muehlbauer FJ.** 2004. QTL mapping of winter hardiness genes in lentil. *Crop Science* **44**, 13-22.
- Kulikova O, Gualtieri G, Geurts R, Kim DJ, Cook D, Huguet T, de Jong JH, Fransz PF, Bisseling T.** 2001. Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **27**, 49-58.
- Labate CA, Leegood RC.** 1988. Limitation of photosynthesis by changes in temperature. *Planta* **173**, 519-527.
- Laucou V, Haurogne K, Ellis N, Rameau C.** 1998. Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 905-915.
- Lejeune-Hénaut I, Bourion V, Eteve G, Cunot E, Delhay K, Desmyter C.** 1999. Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. *Euphytica* **109**, 201-211.
- Lejeune-Hénaut I, Hanocq E, Béthencourt L, Fontaine V, Delbreil B, Morin J, Petit A, Devaux R, Boilleau M, Stempniak JJ, Thomas M, Lainé AL, Foucher F, Baranger A, Burstin J, Rameau C, Giauffret C.** 2008. The flowering locus Hr colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 1105-1116.
- Levitt J.** 1980. Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press., New York, USA.
- Limin AE, Fowler DB.** 2002. Developmental traits affecting low-temperature tolerance response in near-isogenic lines for the vernalization locus Vrn-A1 in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Annals of Botany* **89**, 579-585.
- Lincoln S, Daly M, Lander E.** 1992. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. In Whitehead Institute Technical Report, 3rd edition, Cambridge, MA.
- Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Hénaut I, Burstin J.** 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 1022-1031.

- Loudet O, Chaillou S, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2003. Quantitative Trait Loci Analysis of Water and Anion Contents in Interaction With Nitrogen Availability in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **163**, 711-722.
- Mahfoozi S, Limin AE, Farhad A, Fowler DB.** 2006. Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field Crops Research* **97**, 182-187.
- Marco Gd, Tricoli D.** 1983. RuBP carboxylase determination by enzymic estimation of D-3-PGA formed. *Photosynthesis Research* **4**, 145-149.
- Moreau D, Salon C, Munier-Jolain N.** 2006. Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: an effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant Cell Environment* **29**, 1087-1098.
- Mun J-H, Kim D-J, Choi H-K, Gish J, Debelle F, Mudge J, Denny R, Endre G, Saurat O, Dubez AM, Kis GB, Roe B, Young ND, Cook DR.** 2006. Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. *Genetics* **172**, 2541-2555.
- Nakayama S, Daido H, Abe J.** 1997. Winter hardiness and growth at low temperature in European varieties of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Grassland Science* **43**, 224-230.
- Olien CR, Clark JL.** 1993. Changes in soluble carbohydrate composition of barley, wheat, and rye during winter. *Agronomy Journal* **85**, 21-29.
- Palta JP, Paul HL.** 1980. Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory. *Physiologia Plantarum* **50**, 169-175.
- Pearce RS.** 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* **29**, 47-76.
- Pennycooke JC, Cheng H, Stockinger EJ.** 2008. Comparative Genomic Sequence and Expression Analyses of *Medicago truncatula* and Alfalfa Subspecies *falcata* COLD-ACCLIMATION-SPECIFIC Genes. *Plant Physiology* **146**, 1242-1254.
- Richardson AD, Duigan SP, Berlyn GP.** 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* **153**, 185-194.
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL, Prospero JM.** 2006. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* **6**, 28.
- Rukavina H, Hughes HG, Qian Y.** 2007. Freezing tolerance of 27 saltgrass ecotypes from three cold hardiness zones. *Hortscience* **42**, 157-160.
- Teulat B, Zoumarou-Wallis N, Rotter B, Ben Salem M, Bahri H, This D.** 2003. QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 181-188.

- Thomashow MF.** 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* **50**, 571-599.
- Thoquet P, Gherardi M, Journet E-P, Kereszt A, Ane J-M, Prospero J-M, Huguet T.** 2002. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biology* **2**, 1.
- Vagujfalvi A, Galiba G, Cattivelli L, Dubcovsky J.** 2003. The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 60-67.
- Vogel JT, Zarka DG, Buskirk HAV, Fowler SG, Thomashow MF.** 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *The Plant Journal* **41**, 195-211.
- Voorrips RE.** 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* **93**, 77-78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Tvd, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Wang J, Sun L, Zhang C, Chen G, Wang P, Shi D, LuChuanGen, Xu S.** 2006. Physiological responses to low temperature stress in hybrid rice at seedling stage. *Acta Agronomica Sinica* **32**, 1049-1056.
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB.** 2007. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Ward DA, Keys AJ.** 1989. A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynthesis Research* **22**, 167-171.
- Webb MS, Uemura M, Steponkus PL.** 1994. A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiology* **104**, 467-478.
- Xin Z, Browse J.** 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environment* **23**, 893-902.
- Yadegari LZ, Heidari R, Carapetian J.** 2007. The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Journal of Biological Science* **7**, 1436-1441.
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim DJ, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S.** 2005. Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **137**, 1174-1181.

## **Partie IV.**

**Recherche de gènes  
candidats impliqués dans la  
tolérance au gel chez  
*Medicago truncatula***



## **PARTIE IV. RECHERCHE DE GENES CANDIDATS IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE AU GEL CHEZ *MEDICAGO TRUNCATULA* 104**

I. OBJECTIFS ET DEMARCHE.....	104
II. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE POUR LA RECHERCHE DE GENES REGULES PAR LE FROID ET LOCALISE DANS LES ZONES DE QTL DE TOLERANCE AU GEL.....	104
TITLE.....	105
AUTHORS.....	105
ABSTRACT.....	105
INTRODUCTION.....	106
MATERIALS AND METHODS.....	107
Plant material and environmental conditions.....	107
Genetic linkage map and QTLs mapping.....	108
RNA extraction and microarray hybridization.....	108
Experimental design.....	109
Data processing.....	109
Statistical analysis.....	109
In silico co-location of genes onto genetic map.....	110
RESULTS.....	111
Early and late acclimation response.....	111
Functional categorization of the differentially regulated genes during cold acclimation .....	112
QTL mapping.....	117
In silico co-location of genes into QTL intervals.....	119
Highest fold induced genes.....	131
DISCUSSION.....	133
Early and late acclimation response.....	133
Cold perception and regulation mechanisms in <i>Medicago truncatula</i> cold tolerant plants.....	134
Cold-response of photorespiration.....	134
Cold-response of cryoprotective sugars.....	138
Cold-response of cryoprotective amino acids.....	138
Particular case of wound and disease resistance related genes.....	139
Selection of putative cold-induced candidate genes in QTL intervals.....	140
CONCLUSION.....	143
ACKNOWLEDGEMENTS.....	144
LITERATURE CITED.....	145

## **Partie IV. Recherche de gènes candidats impliqués dans la tolérance au gel chez *Medicago truncatula***

---

### **I. Objectifs et démarche**

Cette étape, qui permet de montrer l'intérêt et la faisabilité de la démarche de cartographie croisée de QTL de résistance au gel et de gènes candidats chez *Medicago truncatula*, a pu être entreprise grâce à l'implication de l'équipe "Architecture racinaire et ARN régulateurs" de l'Institut des Sciences du Végétal (Florian Frugier et Martin Crespi, CNRS Gif sur Yvette). Son objectif était de comparer les ARN messagers produits par les deux parents de la population LR3 au cours de l'acclimatation au froid, ce qui a été possible grâce à l'hybridation, sur la puce Mt16kOLI1Plus du projet européen GLIP. La première étape a été l'établissement d'une liste de gènes différentiellement exprimés entre DZA 045-5 et F83 005-5 et la deuxième étape a été l'utilisation des informations de cartographie physique disponibles pour *Medicago truncatula* pour identifier des gènes candidats correspondants aux intervalles de confiance des QTL cartographiés.

Trois dates de prélèvement avaient été décidées pour permettre d'avoir une cinétique d'expression des gènes : à 1 et à 14 jours d'acclimatation et à 3 heures après l'entrée en phase de gel. A l'analyse des résultats, les deux prélèvements de la phase d'acclimatation se sont révélés très répétables contrairement à celui de la phase de gel. Les gènes obtenus pour ces prélèvements de la phase de gel n'étaient pas conservés d'une lame à l'autre, donc leur analyse n'était pas indiquée. Pour éviter d'utiliser tout résultat non fiable, les échantillons de cette phase de gel avaient donc été éliminés pour la suite des analyses.

### **II. Analyse transcriptomique pour la recherche de gènes régulés par le froid et localisé dans les zones de QTL de tolérance au gel**

Cette partie a été rédigée sous forme d'article, en préparation pour une soumission.

## **TITLE**

Correlating QTLs for freezing tolerance and related physiological traits to genes differentially expressed during cold-acclimation in the model legume *Medicago truncatula*

## **AUTHORS**

Komlan Avia, Sandrine Blanchet, Anca Lucau, Sandrine Imbeaud, Jean-Laurent Ichanté, Nasser Bahrman, Martine Niarquin, Marie-Laure Pilet, Odile Jaminon, Anne-Sophie Niquet, Hervé Delacroix, Bruno Delbreil, Martin Crespi, Florian Frugier, Isabelle Lejeune-Hénaut.

## **ABSTRACT**

The numerous genomic resources available and the on going sequencing project of the model legume *Medicago truncatula* have set the use of this species to facilitate the understanding of mechanisms and genes governing freezing tolerance in pea. In a previous study, we used a RIL population derived from the cross between two contrasted lines for freezing tolerance (L000530 named F 83005-5, tolerant, and L000735 or DZA045-5, sensitive) to detect QTLs for freezing damage and related physiological traits. The results showed QTLs co-locating on LG1, LG4 and LG6. Here we have undertaken a transcriptomic analysis, comparing samples of the two parental lines after one day and fourteen days under cold acclimation conditions (8/2°C, day/night), using the Mt16kOLI1Plus microarray. We found 400 genes differentially expressed. In fact these genes were cold-regulated, and among them, 202 were up-regulated and 198 were down-regulated. To correlate the transcriptomic results to the detected QTLs, Blast search has been performed to identify genes mapping in the QTL intervals. Overall, ten genes were retained as being highly up-regulated during cold acclimation and located in QTL intervals. Putative products encoded by these genes are: DREB/CBF, ribosomal protein, lectin, UDP-glycosyltransferase, heat-shock protein, LEA 4 protein, glutathione transferase, F-Box protein, endochitinase and HMG protein. Polymorphism search can be performed within sequences of these genes for genetic mapping, to detect those of them that are more tightly linked to the freezing tolerance QTLs.

## **KEY WORDS**

*Medicago truncatula*, freezing tolerance, microarray analysis, candidate genes, cold acclimation, differential gene expression.

## INTRODUCTION

By causing important yield losses in crops, low temperature has been targeted as one of the most breeding goal environmental stress to manage (Weiser, 1970; Levitt, 1980; Boyer, 1982). Consequently, freezing tolerance has been studied in a broad range of plant species to decipher its mechanisms. Several plant species are able to increase their freezing tolerance by a preceding exposure to low non freezing temperature, a phenomenon known as cold acclimation (Thomashow, 1990, 1999). Since a few years now, cold acclimation and subsequent freezing tolerance have been largely studied concerning their morphological, physiological, biochemical and molecular mechanisms, notably in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Thomashow et al., 1996; Gilmour et al., 1998; Thomashow, 1999; Viswanathan and Zhu, 2002). Those studies, demonstrated that plant's response to environmental stresses such as low temperature involves very complex mechanisms. Cold is sensed as a signal that is transduced in cascades in cells through transcription factors such as *CBF/DREB* (C-repeat Binding Factor/Dehydration Responsive Element Binding), and leading to expression of several genes (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Fowler and Thomashow, 2002). These genes involved in freezing tolerance are collectively called *COR* (cold-regulated) genes and they trigger various mechanisms including the production of cryoprotective polypeptides such as COR15a (Steponkus et al., 1998), the synthesis of cryoprotectants such as proline or sugars (Gilmour et al., 2000; Taji et al., 2002) or the synthesis of glutathione which is involved in the detoxification of oxygen radicals (Kocsy et al., 2000; Yu et al., 2002; Janda et al., 2003).

By studying model species, the plant scientific community has greatly increased the understanding of different mechanisms in complex genome crops. The examples of *Arabidopsis thaliana* as model for crucifers (Pang and Meyerowitz, 1987) or *Oryza sativa* for cereals (Kochert, 1992) are eloquent. While several genes, such as the *CBF* regulon have been widely described in species like *Arabidopsis thaliana* as involved in freezing responses, only few have been reported in legumes. Furthermore, close to one third of the genes induced by cold are not responsive to *CBF* regulation (Vogel et al., 2005), and although low temperature sensing and transduction may be common to many plant species, the ultimate response is not (Monroy et al., 2007).

Recently, *Medicago truncatula*, a self pollinating, relatively small genome annual legume has been established as a model to facilitate genetic analyses in leguminous plants

such as pea, and its genome is being sequenced (Young et al., 2005). In a previous study (Avia et al., 2008), QTLs for freezing damage, as well as physiological parameters involved in cold responses, have been mapped in a RIL population derived from a cross between two parental lines contrasted for their freezing tolerance. Three of the *M. truncatula* height linkage groups (LG1, LG4 and LG6) held many co-locating QTLs, showing their interest for putative candidate genes search.

In this study, we used *M. truncatula* 16k oligonucleotides microarrays to monitor gene expression alteration after one and fourteen days under acclimating conditions in both parents of the RIL population, F 83005-5 (tolerant) and DZA 045-5 (sensitive). The two lines were thus compared to each other at each sampling point to detect differences in their gene expression. Results of this transcriptomic analysis were compared to QTLs intervals to retrieve most interesting cold regulated genes, putative candidates for freezing tolerance in *M. truncatula*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plant material and environmental conditions*

Two lines of barrel medic differing for freezing tolerance were used: L000530 named F 83005-5 and hereafter referred to as F 83005-5, described as freezing tolerant and L000735 named DZA 045-5 hereafter referred to as DZA 045-5, described as freezing sensitive (Avia et al., 2008). Plants were germinated and grown in climate controlled conditions at a mean photosynthetic active radiation (PAR) of  $550 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and 14/10h (day/night) photoperiod. Temperature conditions were subdivided into three different phases: Nursery phase (N) for optimal growth conditions with 20/14°C (day/night) during 15 days, Pre-Acclimation (PAcc) with 12/12°C (day/night) during 8 days, and Acclimation (Acc) with 8/2°C (day/night) during 14 days. Three repeats of 5 plants each were harvested for either genotype and pooled after just one day in the Acc phase (early acclimation, EA) and on the 14<sup>th</sup> (last) day in Acc (late acclimation, LA). From harvested plants, roots plus collars were immediately frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. Control plants were kept in culture and were freeze-treated for 8 days (-6/4°C day/night), then were passed through 14 days at 16/5°C (day/night) for freezing damage scoring.

### *Genetic linkage map and QTLs mapping*

A population of 178 F5-derived recombinant inbred lines (called LR3) from the cross between F 83005-5 and DZA 045-5 was used for genetic linkage map construction as described in Avia et al. (2008). In addition to the 178 molecular markers previously described, four new SSR markers (004F08, 003A02, h2\_166b10a and h2\_31k19b) anchored to the integrated reference genetic-physical map of the University of Minnesota (UMN, <http://www.medicago.org/genome/map.php>; Mun et al., 2006) were mapped to the LG6. The new genetic linkage map comprised a total of 182 markers, covering 1225 cM.

QTL analyses were performed with Windows Cartographer V2 (Wang et al., 2007). Composite Interval Mapping (CIM) was run using model 6. For each trait, the LOD significance threshold was determined after running 1000 permutations test ( $\alpha=0.05$ ). Cofactors were selected with the Forward and Backward regression method. The confidence interval of QTL position was estimated as the interval between positions where the LOD value decreased by 1 and 2 units respectively, relative to that of the most likely position. The software Mapchart 2.2 (Voorrips, 2002) was used to draw the QTLs on the map.

### *RNA extraction and microarray hybridization*

RNA extraction from roots and collars samples was performed using the TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Invitrogen). RNA cleanup (DNase I treatment) was performed using the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). RNA purity was then estimated using the ratio of spectrophotometer readings at 260 nm and 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) for each sample. Quantification and check of RNA integrity were analyzed by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent technologies). Reverse transcription, dye-labeling and preparations for hybridization were realized using the Amino Alkyl MessageAmp<sup>TM</sup> II aRNA Amplification kit and following the manufacturer's instructions (Ambion Inc.).

Mt16kOLI1Plus microarrays produced by the Institute for Genome Research of Bielefeld University (<http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/>) were used for hybridization. Each microarray contained 16509 different 70mer oligonucleotides duplicated spots. The Mt16kOLI1Plus microarrays represent all 16086 tentative consensus sequences (TCs) of the DFCI *M. truncatula* Gene Index 5 (Medicago Genome Oligo Set Version 1.0 Upgrade, Operon), plus a set of 384 oligonucleotides representing transcription factors and regulators together with controls (for details, see: <http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/legume/microarrays/microarrays.html>). Mt16kOLI1Plus microarrays were blocked and Nexterion hybridization buffer was used for 14-18h hybridization in Corning

chamber at 42°C. The slides were washed by successive baths containing saline sodium citrate 2x (with SDS 0.1x), 0.2x, and 0.1x.

### *Experimental design*

In order to distinguish early from late cold-responses, two experiments were done: the gene expression of F 83005-5 tolerant genotype roots plus collars was compared on the same microarray with the gene expression of DZA 045-5 sensitive genotype roots plus collars for two different times of cold acclimation, EA and LA. Dye labeling for each paired sample was reversed in two subsequent individual hybridizations. Four independent repetitions were carried out for each experiment.

### *Data processing*

Data processing was computed using the MAnGO tools suit version 1.0 (Marisa et al., 2007), an R script that allows integrated analysis of two-color microarrays. Log intensity ratios for each spot were obtained after background subtraction. Systematic biases were corrected by applying successively an intensity dependent print-tip lowess normalization (Smyth and Speed, 2003) and a scale between-array normalization (Yang et al., 2002). A filtering procedure excluded those data points considered unreliable as they correspond to probe sets associated with low signal intensities or bad quality features. The array data were submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus public depository, according to the minimum information about a microarray experiment checklist, series entry "GSEXXX".

### *Statistical analysis*

The differential analysis was conducted using the R environment and the R package 'BioConductor/Limma package version 2.10.5 (Smyth, 2005). Precisely, empirical Bayes moderated t-statistics were computed on the log intensity ratios for each gene. Duplicate spots printed on the arrays were considered as repeated measures; a total of 16470 unique genes were analyzed. All p-values obtained were adjusted by the false discovery rate step-up method of Benjamini and Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) to account for multiple testing. Differentially expressed genes were defined as those whose p-value was statistically significant at a level of  $p < 0.001$ , with expression ratios  $\geq 2$  or  $\leq 0.5$  and for which the mean intensity of the two channels was higher than 7 on the log<sub>2</sub> scale. Functional groups were realized for significant expressed genes using MIPS Functional Catalogue at <http://mips.gsf.de/projects/funecat> (Ruepp et al., 2004). Hierarchical clustering analysis using

Treeview program (Eisen et al., 1998) and Venn diagram were applied to the significantly differentially expressed genes.

#### *In silico co-location of genes onto genetic map*

Sequences of the cold-regulated genes obtained from the transcriptomic analysis were retrieved from the DFCI web site (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) using the correspondent *M. truncatula* Gene Index (MtGI) 8 annotations. Each sequence was then blasted against the *M. truncatula* pseudogenome release version 2 (Mt2.0) using Blastn and Blastx search (Altschul et al., 1997) of the CViT-Blast ([http://www.medicago.org/genome/cvit\\_blast.php](http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php)) with an E-value cutoff of  $1e^{-20}$ . Results for all genes matched were sorted according to BAC accessions and for one given chromosome and only the highest scored for each gene in a same BAC was kept. An excel sheet of a report on all markers (marker location, the associated BACs, FPC, primers/full sequences) was downloaded from <http://www.medicago.org/genome/downloads.php#markerseqs>. BAC names of two consensus genetic-physical map markers flanking an interval encompassing maximum co-locating QTLs on each concerned LG were determined by comparing the LR3 genetic map to the consensus one according to common anchored markers. Sequence assembly BACs table for each chromosome was downloaded from [http://www.medicago.org/genome/assembly\\_table.php?chr=1](http://www.medicago.org/genome/assembly_table.php?chr=1). Using this table, all BACs contigs within the interval of the two previous marker BACs were retrieved. This list was compared to BACs containing the cold-regulated genes obtained previously by Blast search. Hence, BACs that were present in the contig list were highlighted and only genes within those BACs were kept for candidate analysis. Repeated genes, with a same profile were kept in a single copy together with the TIGR MtGI8 annotation.

For putative candidate genes analysis, all unique genes highly expressed within the QTL intervals were searched for their potential relations with cold stress in the literature, based on the MtGI8 annotations. When several genes were found related to same functions, only one was kept for further discussion. In a second step, sequences of known cold-regulated genes described in other plants such as *A. thaliana* different *COR* genes, *AtLTI78*, *AtKINI*, barley different *DHN*, wheat *COR15* and *WCS120*, soybean *P5C5*, antifreeze proteins (chitinase, beta-1,3-glucanase, thaumatin-like), LEA and ABA-induced genes were searched on the NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Blast similarity search was performed against *M. truncatula* pseudogenome. The goal of this search was to check



whether some interesting genes mapped in the QTL intervals while not detected by our transcriptomic analysis. In some cases, complete BAC sequence was used for gene prediction using the FGENESH program (Salamov and Solovyev, 2000) and coding sequences were blast searched in the NCBI plant database.

## RESULTS

### *Early and late acclimation response*

Gene expression patterns of 16,509 genes of the *M. truncatula* genome were analyzed at two different periods of a cold acclimating kinetics, EA and LA. The two time points were designed after 1 day (EA) and 14 days (LA) of cold exposure to identify early and late acclimation response of genes specifically characterizing the F 83005-5 tolerant genotype. In each experiment, the DZA 045-5 sensitive genotype was used as control to eliminate genes equally expressed at day 1 and day 14 in F 83005-5 and DZA 045-5 genotypes during growth and development of the acclimation phase. A global interpretation of the early, permanent or late response was done (Figure 1). Four hundred differentially expressed genes were detected, among which 202 were up-regulated and 198 were down-regulated by the cold stress. Considering the early response, 26 genes were found as early up-regulated in the F 83005-5 tolerant genotype and only 4 genes were found as early down-regulated. As for the late response, we detected 2-fold more down-regulated genes than up-regulated genes.

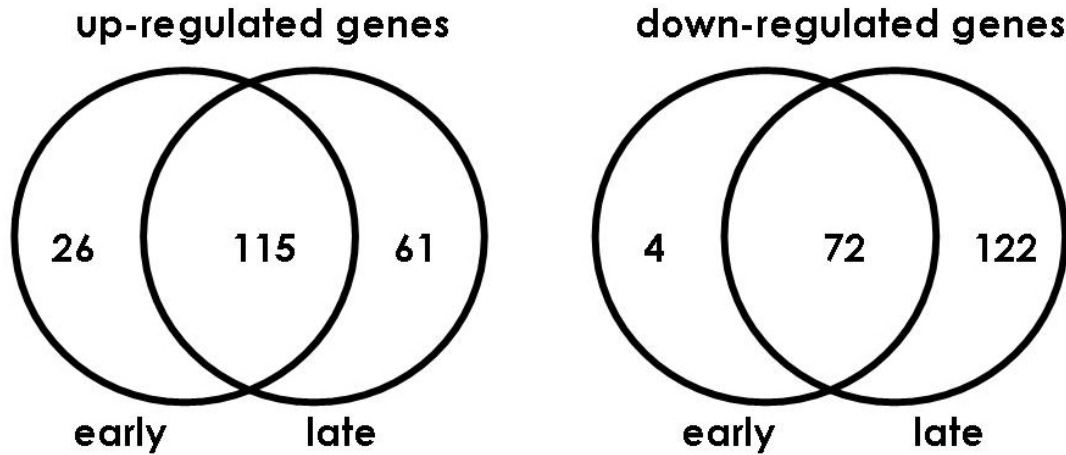


Figure 1. Venn diagram representing up-regulated and down-regulated genes found in early or late acclimation response in the *Medicago truncatula* tolerant genotype F 83005-5.

#### *Functional categorization of the differentially regulated genes during cold acclimation*

Genes differentially expressed at day 1 and day 14 of acclimation in F 83005-5 and DZA 045-5 are presented in Figure 3. These genes were categorized into 17 functional groups (Figure 2) using the Functional Catalogue, with manual adjustment when necessary (Ruepp et al., 2004). The most affected categories, especially in the EA samplings were the environmental related proteins together with those involved in metabolism, cell rescue. Cell wall modifications and protein activity regulation were also significantly affected in the EA samplings.

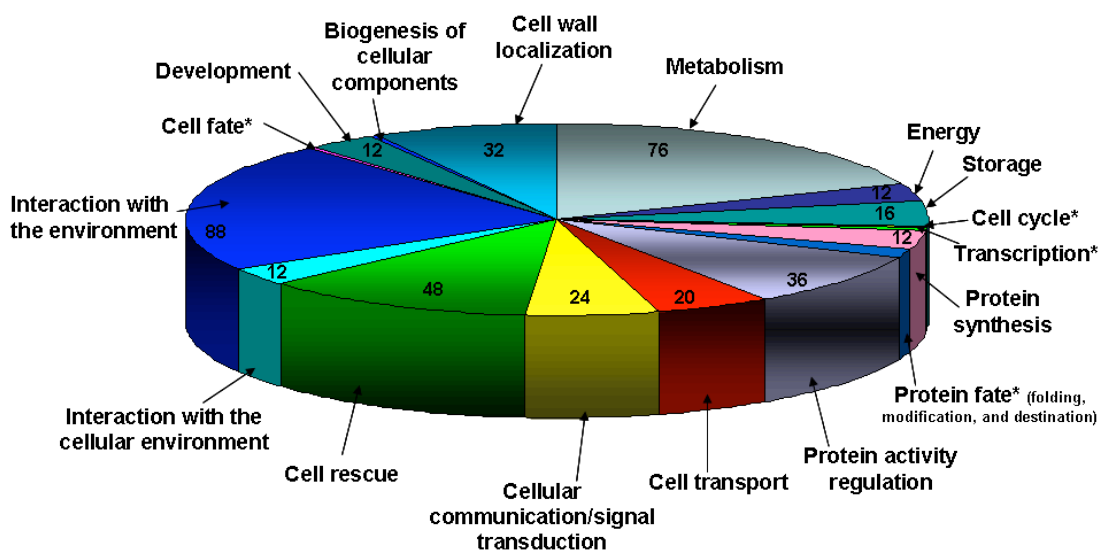
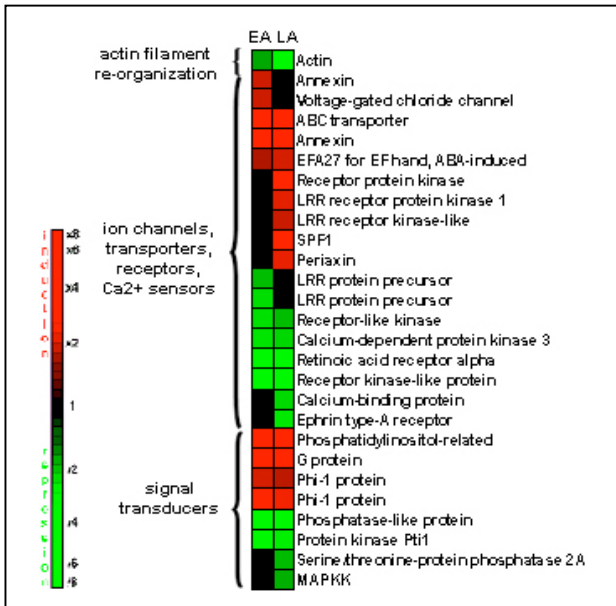
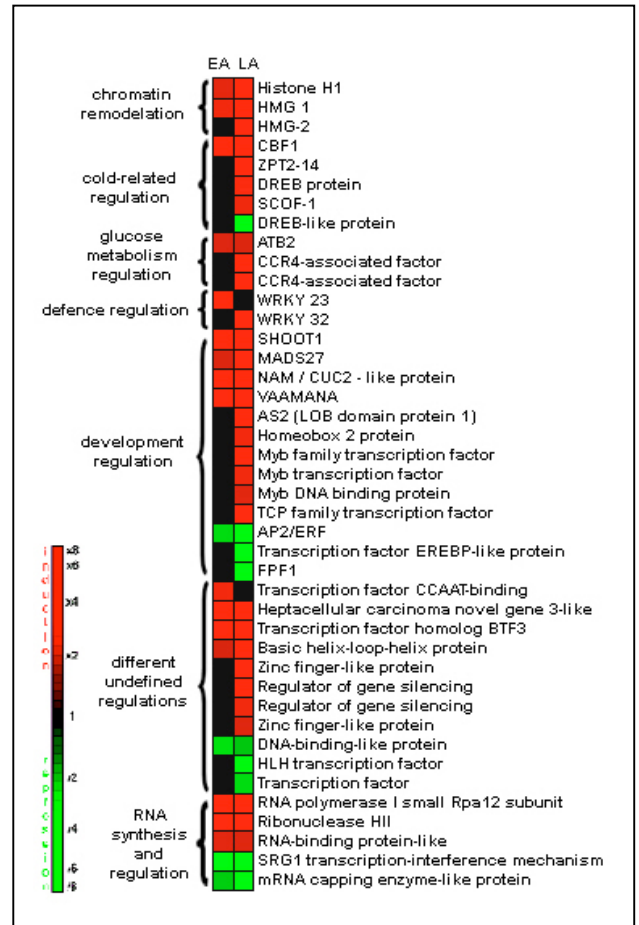


Figure 2. Principal functional categories of the differentially expressed genes from transcriptomic analysis. \*Categories representing less than 2% of the total expressed genes.

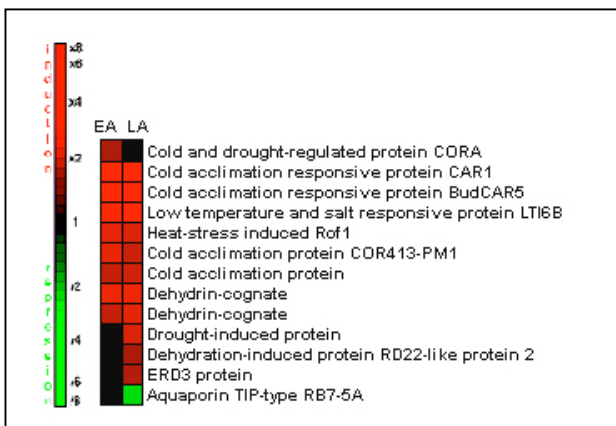
### A: Perception and signal transduction



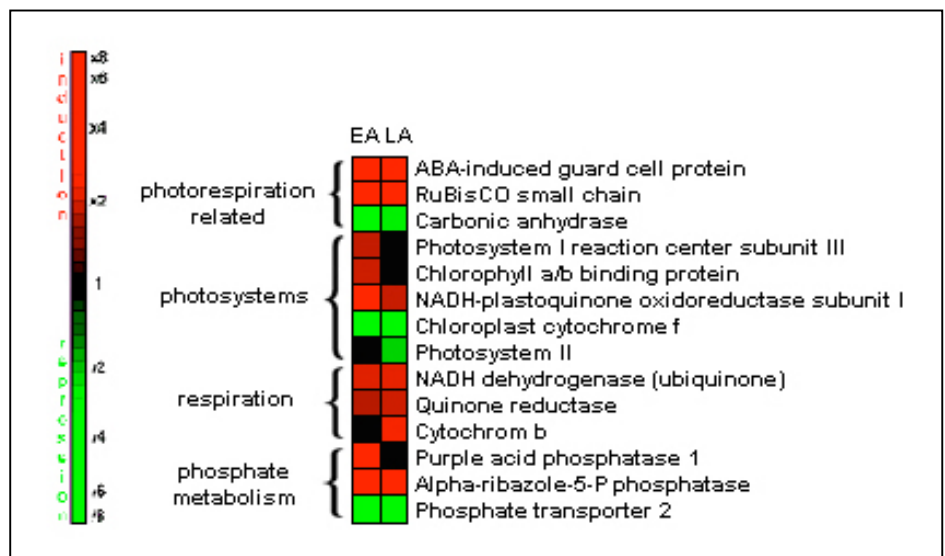
### B: Regulation



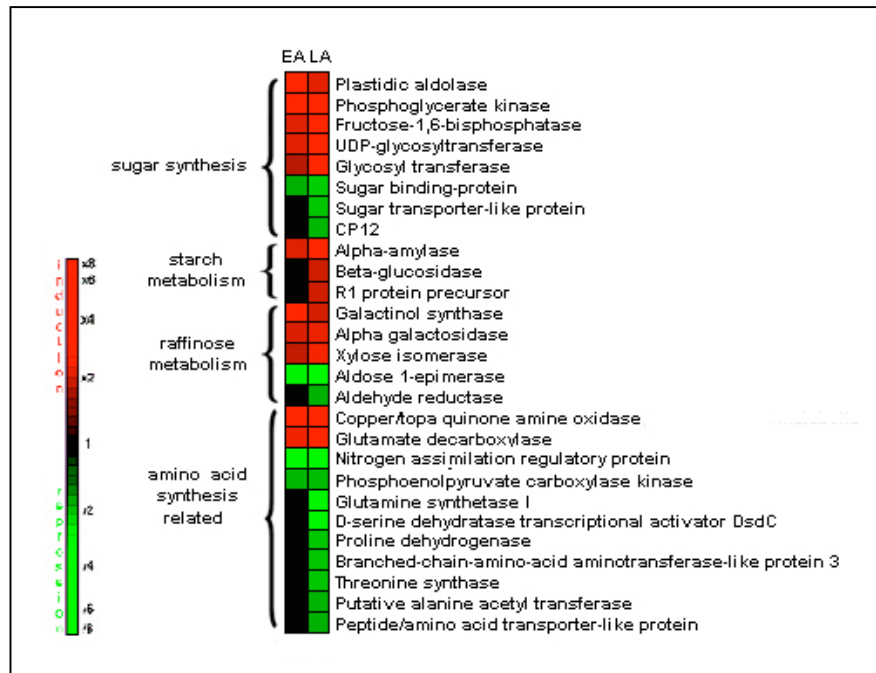
### C: Cold-induced and dehydration-related



### D: Energy production

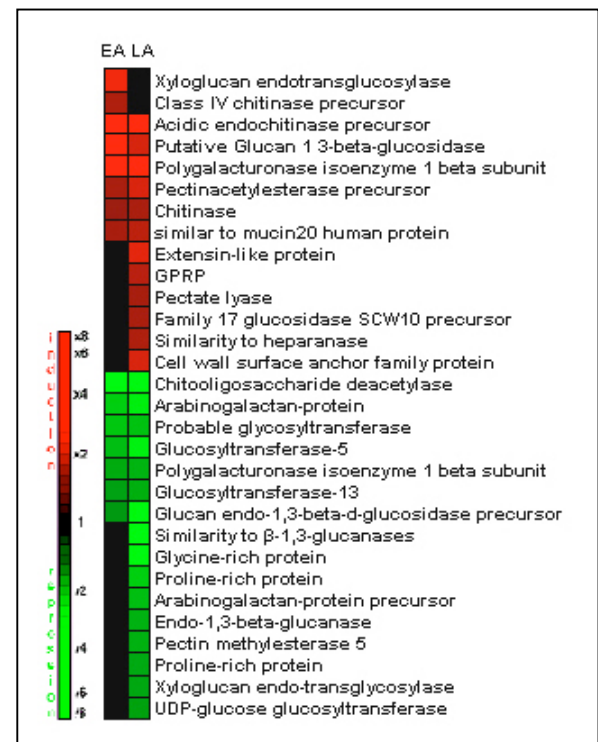
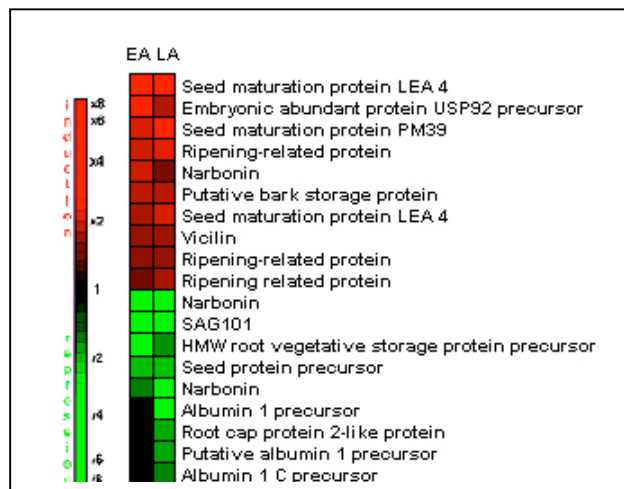


### E: Cryoprotective sugars and amino acid synthesis

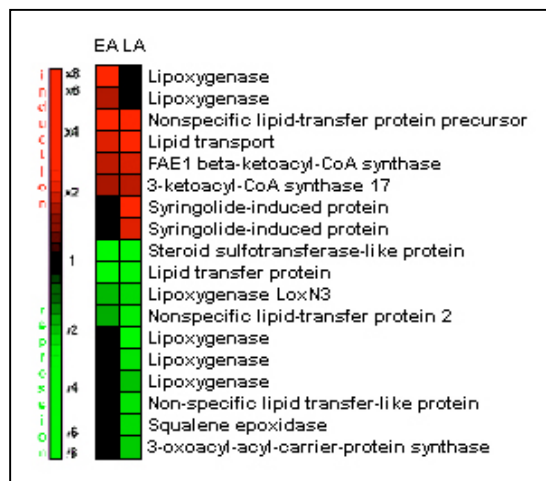


### G: Cell wall-related functions

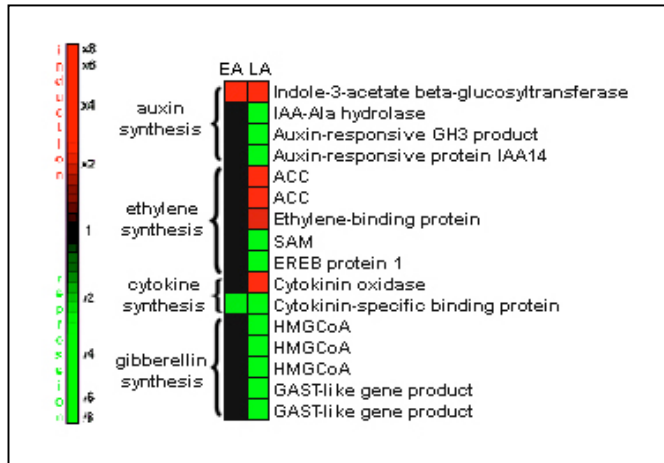
#### F: Dormancy



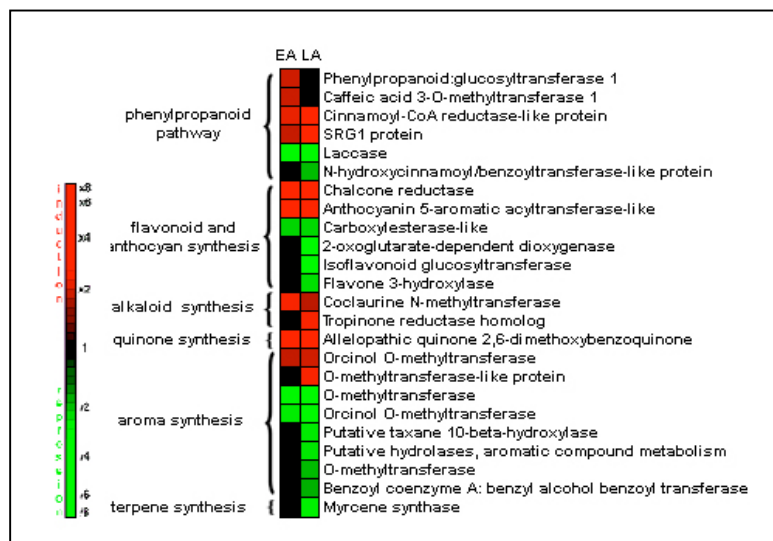
#### H: Lipid metabolism



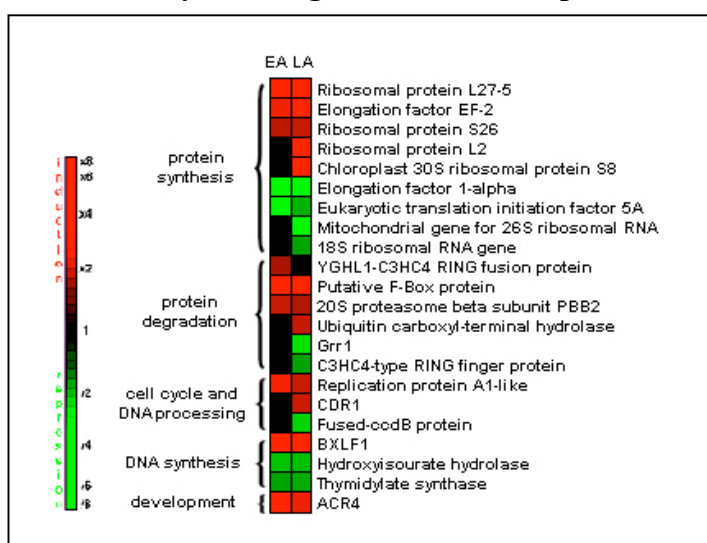
### I: Hormone synthesis



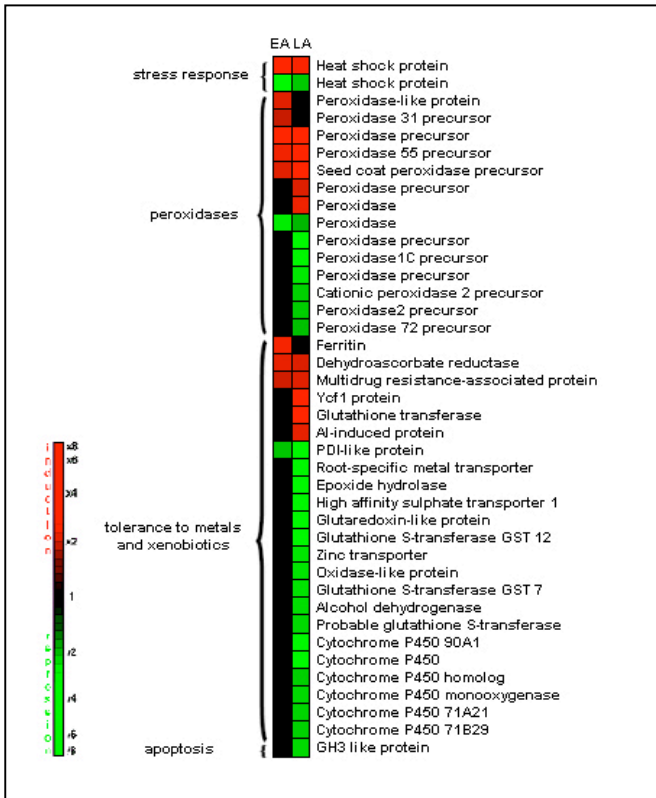
### J: Secondary metabolism



### K: Protein synthesis, growth and development



**L: Cell rescue**



**M: Wound and pathogenesis responses**

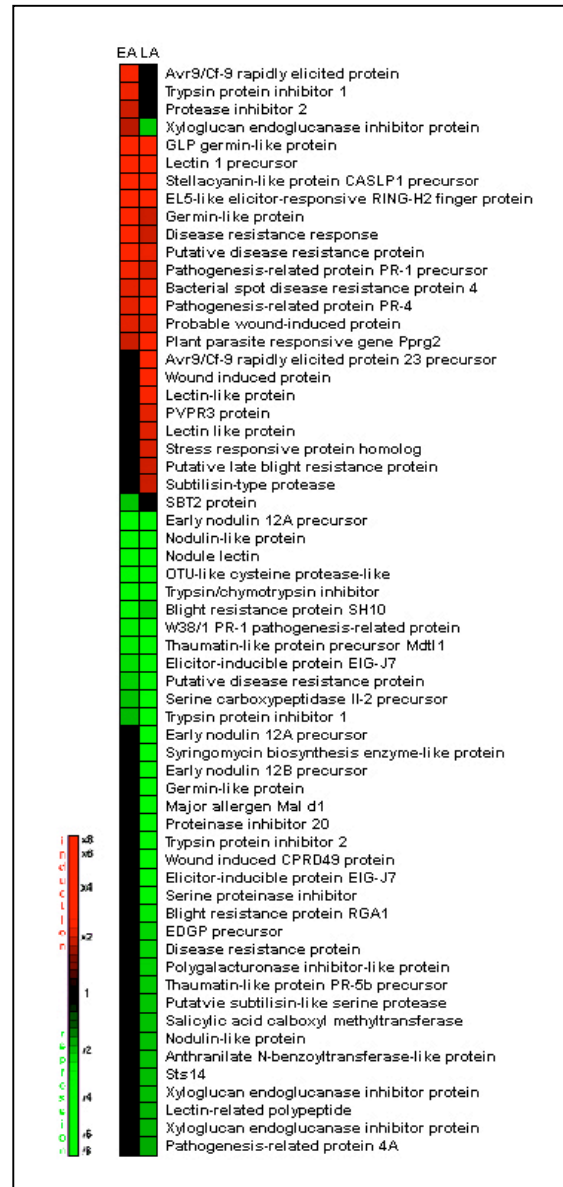


Figure 3. Profile expression of acclimation regulated genes differentially expressed between F 83005-5 tolerant and DZA 045-5 sensitive plants. Red color indicates gene induction, whereas green color indicates repression. Induction corresponds to a log2 ratio  $\geq 1$ , and repression to a log2 ratio  $\leq -1$ . Only annotated genes were represented. EA: early acclimation; LA: late acclimation.

### *QTL mapping*

QTLs for freezing damage score and related physiological parameters were previously described by Avia et al. (2008). Following an addition of four new markers on LG6 that were anchored to the integrated genetic-physical map (UMN-map), QTLs detection was performed once again. Results showed that almost all previously detected QTLs were found again and a few additional ones were found. Only the most important QTLs, on the LG1, LG4 and LG6 are presented here (Table 1, figures 4, 5 and 6). On the LG6, the peak LOD marker where several QTLs co-located was found at MTIC153 once again, at 122cM.

Table 1. QTLs parameters in *M. truncatula* population LR3. Traits significances are as follow: CC for chlorophyll content, ElecLeak for electrolyte leakage, FDS2W for freezing damage score after 2 weeks under warming conditions, FDS1D to FDS8D for freezing damage score after 1 to 8 days of freezing, SFW for shoot fresh weight, SDW for shoot dry weight, RFW for root fresh weight, RDW for root dry weight, NOL for number of leaves and LA for leaf area. Each QTL name is followed by its LG and when same type of QTL is repeated on the same LG, QTLs names are followed by the LG name and a rating number. Additive effects of F 83005-5 line are shown for each trait.

Trait	LG	QTL peak position	LOD	Additive effect of line F 83005-5	R <sup>2</sup>	LOD-2_L	LOD-1_L	LOD-1_R	LOD-2_R
FDS1D-Ig4	4	104.01	3.08	-0.12	6.51	100.3	102	104.6	107.8
FDS1D-Ig6	6	92.41	2.97	-0.10	6.57	79.3	83.7	93.5	93.5
FDS2D-Ig6.1	6	6.01	3.33	-0.08	5.98	1	3.4	15.7	23.5
FDS2D-Ig6.2	6	122.31	8.02	-0.13	15.55	117.9	119.6	122.8	123.5
FDS2D-Ig6.3	6	138.21	6.79	-0.12	14.13	132.2	136.6	141.2	144.1
FDS3D-Ig6	6	122.31	7.07	-0.19	16.47	119.8	120.6	123.2	124
FDS4D-Ig6.1	6	122.31	6.02	-0.15	12.37	116.8	119.4	126.8	127.5
FDS4D-Ig6.2	6	136.21	4.26	-0.13	9.33	128.8	128.8	138.2	138.2
FDS5D-Ig6.1	6	122.31	6.53	-0.16	14.08	116.9	119.3	125	128.7
FDS5D-Ig6.2	6	138.21	4.06	-0.13	9.48	132.2	132.2	138.4	138.5
FDS6D-Ig4	4	104.31	2.63	-0.10	5.19	92.8	93.7	110.3	111.3
FDS6D-Ig6	6	122.31	8.06	-0.17	17.17	118.1	120.1	127.5	128.4
FDS7D-Ig6	6	122.31	5.62	-0.14	12.32	106.4	118.6	126.1	132.2
FDS8D-Ig6	6	122.31	5.97	-0.15	12.67	113	118.7	127.1	136.4
FDS2W-Ig1.1	1	73.41	5.21	-0.17	7.24	63.2	66.2	79.7	80.4
FDS2W-Ig1.2	1	88.41	4.06	-0.15	5.46	82.4	83.2	91	93.7
FDS2W-Ig1.3	1	123.2	3.35	-0.15	5.54	110	113	129.2	129.2
FDS2W-Ig4	4	113.31	6.63	-0.20	9.56	105.1	106.8	121.1	127.4
FDS2W-Ig6.1	6	122.31	22.58	-0.39	39.74	120.4	120.4	124.8	127.3
FDS2W-Ig6.2	6	130.81	15.20	-0.35	28.24	128.8	129.1	131.3	132
FDS2W-Ig6.3	6	136.21	18.22	-0.38	34.37	135.1	135.9	138.2	138.2
ElecLeak-Ig1	1	117.6	2.73	-5.63	5.00	98.00	112.50	121.00	129.80
ElecLeak-Ig4	4	111	3.40	-7.04	6.11	102.50	106.00	114.00	115.50
ElecLeak-Ig6.1	6	122.31	7.71	-9.96	15.99	119.2	120.4	127.3	127.4
ElecLeak-Ig6.2	6	136.21	7.59	-10.50	18.55	132.9	134.5	138.2	138.3
NOL-Ig4.1	4	106.31	2.99	0.54	7.24	104.1	104.2	111.3	111.3
NOL-Ig4.2	4	121.91	3.68	0.63	9.92	111.3	119.9	128.1	128.8
LA-Ig1	1	109.61	6.22	1.86	15.17	104.2	105.4	111.3	114.5
LA-Ig4	4	19.6	3.64	-1.98	8.99	12.8	13.8	22.3	22.3
CC-Ig1	1	110.11	7.48	2.36	13.96	107	108.6	113.8	126.7
CC-Ig6	6	142.91	3.63	1.63	6.21	134.2	137.2	145.8	147.5
SFW-Ig4	4	0.01	3.60	-0.06	8.67	0	0	5.9	8
SDW-Ig1	1	110.11	3.36	0.02	7.71	103.9	106	116.1	128.7
SDW-Ig4	4	0.01	3.64	-0.02	8.91	0	0	7	9.7
RFW-Ig1	1	102.41	3.78	0.07	9.33	100.1	101.8	102.7	103.1
RFW-Ig6	6	174.61	2.77	-0.07	8.62	165.9	166.4	178.6	178.6



Table 1 (continued)

Trait	LG	QTL peak position	LOD	Additive effect of line F 83005-5	R <sup>2</sup>	LOD-2_L	LOD-1_L	LOD-1_R	LOD-2_R
RDW-Ig1	1	110.11	4.26	0.01	8.76	104.1	105.9	116.6	128.4
RDW-Ig4.1	4	106.31	2.56	0.01	5.77	104	104.2	110.3	111.3
RDW-Ig4.2	4	119.91	3.20	0.01	7.21	111.3	117.2	128.2	128.9
RDW-Ig6.1	6	118.41	4.06	0.01	9.19	110.8	113.3	120.4	122.3
RDW-Ig6.2	6	163.91	5.64	-0.02	13.28	158.6	160	175.2	178.6
SDW/RDW-Ig6.1	6	122.31	4.61	-0.61	10.44	117.9	120	127.3	128.8
SDW/RDW-Ig6.2	6	136.21	4.10	-0.70	11.84	128.8	135.6	138.2	138.2
SDW/RDW-Ig6.3	6	168.61	3.26	0.46	8.48	165.9	167	178.6	178.6

*In silico co-location of genes into QTL intervals****Genes mapping in QTL interval on LG1***

Four markers of the LR3 LG1 were anchored to the UMN integrated genetic-physical map. An interval of 26 cM on the UMN map, between markers MTIC125 and MTIC064 was considered for candidate genes search (figure 4). According to the sequence assembly table of the Mt2.0 for the LG1 ([http://www.medicago.org/genome/assembly\\_table.php?chr=1](http://www.medicago.org/genome/assembly_table.php?chr=1)), a contig of 117 BACs was found within this zone. Out of the 400 differentially expressed genes obtained from the transcriptomic analysis, 73 fell within this interval, embedding in 71 BACs (Table 2). Their distribution over the different functional groups is summarized in Table 3.

### UMN map-LG1

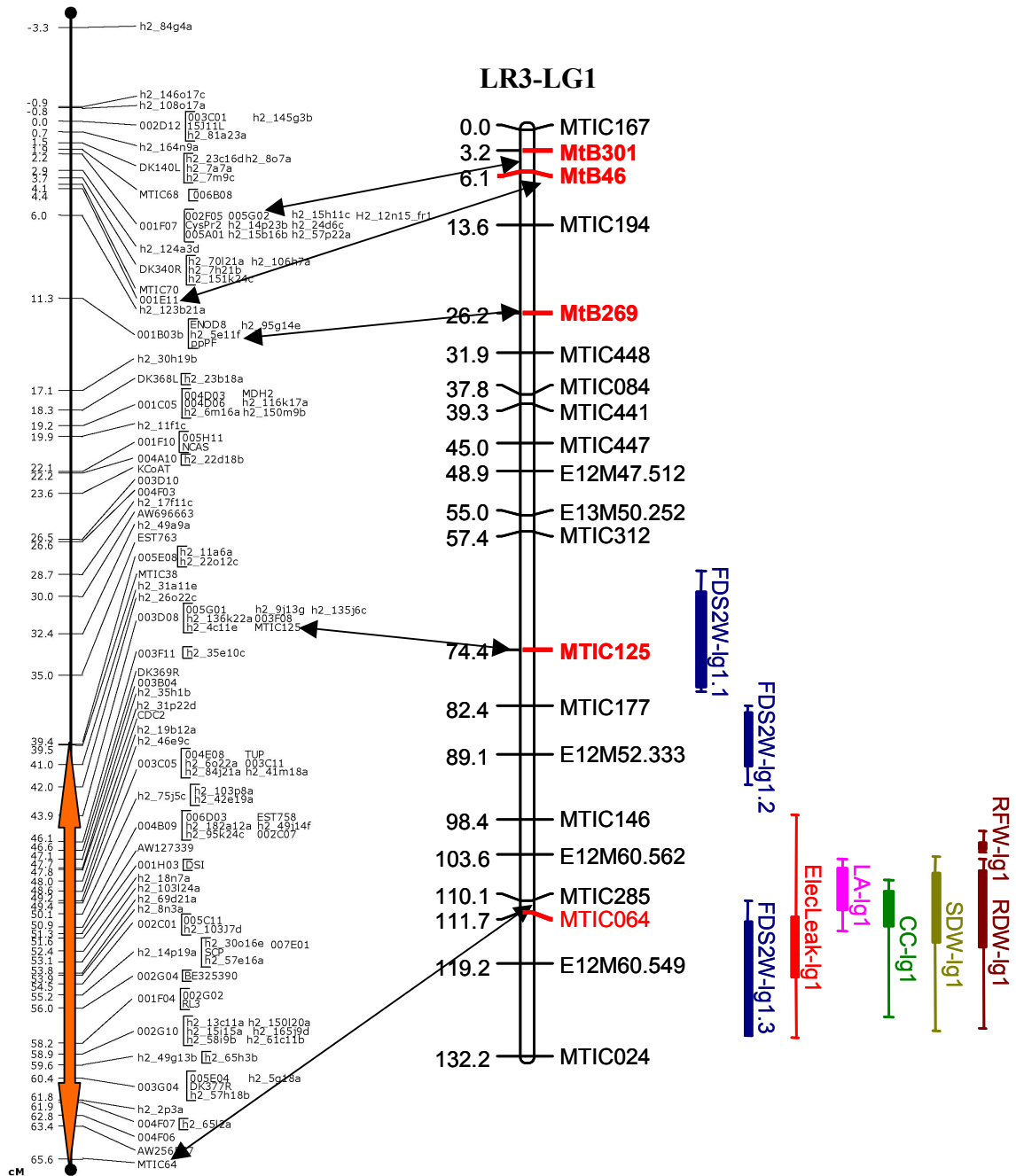


Figure 4. *M. truncatula* LR3 LG1 genetic map and freezing related QTLs. Markers in red are common with genetic markers (shown by black arrows) on the integrated genetic-physical UMN map (on the left) and markers in bold are anchored to sequenced BACs on the Mt2.0. An interval of 26 cM (orange arrow) on the LG1 of the UMN map was considered for candidate genes research. See Table 1 for traits description.

Table 2. Differentially expressed genes from transcriptomic analysis localizing in the 26 cM interval on LG1 of the UMN-map as shown in figure 4. For each gene, TIGR *M. truncatula* genbank ID and gene prediction as of MTGI8 are shown along with gene expression ratio mean after one day (M\_EA) and after 14 days (M\_LA) under acclimation conditions.

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC96463	7.30	7.92	TC96463 weakly similar to UP Q9FYT2 (Q9FYT2) Stellacyanin-like protein CASLP1 precursor, partial (34%); A gene encoding stellacyanin is induced in <i>Capsicum annuum</i> by pathogens, methyl jasmonate, abscisic acid, wounding, drought and salt stress	Regulation
TC95760	6.41	2.29	TC95760 homologue to UP Q9SC38 (Q9SC38) Germin-like protein (Fragment), partial (39%)	Lipid metabolism
TC108447	5.75	3.99	TC108447 weakly similar to UP Q6T1D0 (Q6T1D0) Peroxidase precursor, partial (39%)	Lipid metabolism
TC101001	4.60	2.30	TC101001 weakly similar to UP Q41679 (Q41679) Narbonin (Fragment), partial (71%); storage protein	Dormancy
TC96570	4.27	3.30	TC96570 weakly similar to UP Q6A174 (Q6A174) Copper/topa quinone amine oxidase (Fragment) , partial (45%); nitrogen metabolism	Regulation
TC100171	3.20	1.34	TC100171 similar to UP O24470 (O24470) Lipoygenase, complete	Wound and pathogenesis
TC101879	3.02	2.38	TC101879 weakly similar to UP Q8LA24 (Q8LA24) Replication protein A1-like, partial (18%)	Cold induced and dehydration related
TC100686	3.01	2.67	TC100686 similar to (Q8LGC3) Putative disease resistance protein, partial (88%) defense response	Wound and pathogenesis
TC97943	2.93	3.42	TC97943 similar to UP Q5RM57 (Q5RM57) Drought responsive element binding protein, partial (50%)	Cell rescue
TC94011	2.92	2.71	TC94011 similar to UP O82161 (O82161) Phi-1 protein, partial (79%)	Regulation
TC100303	2.83	3.00	TC100303 similar to UP Q43626 (Q43626) Vicilin 47kD protein, partial (96%) seed storage protein of legumes.	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC101546	2.50	3.44	TC101546 weakly similar to UP Q6VAB3 (Q6VAB3) UDP-glycosyltransferase 85A8, partial (66%); Q6VAB3 transferase activity, transferring hexosyl groups, glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides	Dormancy
TC102853	2.44	1.81	TC102853 similar to UP WR23_ARATH (O22900) Probable WRKY transcription factor 23 (WRKY DNA-binding protein 23), partial (41%)	Perception and signal transduction
TC108403	2.31	1.19	TC108403 similar to UP Q8LNY0 (Q8LNY0) Protease inhibitor 2 (Fragment), partial (75%)	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC107863	2.26	3.12	TC107863 weakly similar to UP Q41695 (Q41695) Pectinacetyltransferase precursor , partial (89%)	Regulation
TC106760	2.22	3.53	TC106760 similar to UP Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F611.30/F611.30) (At1g17020/F611.30), partial (33%); oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC108864	2.18	2.37	TC108864 similar to UP Q9LK64 (Q9LK64) Multidrug resistance-associated protein (MRP); ABC-transporter, partial (26%)	Protein synth. growth and dev.
TC94309	2.13	0.42	TC94309 similar to UP Q8GT67 (Q8GT67) Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein, partial (85%)	Regulation
TC95065	2.03	2.24	TC95065 similar to UP Q5XEP9 (Q5XEP9) At1g04220, partial (66%); Q5XEP9 3-ketoacyl-CoA synthase 17, Very long-chain fatty acid condensing enzyme 17, Fatty acid biosynthesis	Perception and signal transduction
TC100609	1.80	2.31	TC100609 similar to UP Q94II3 (Q94II3) ERD3 protein, partial (88%); early-response-to-drought-3	Regulation
TC100473	1.73	2.54	TC100473 similar to UP Q6H7C7 (Q6H7C7) TCP family transcription factor-like, partial (38%); The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant cell division so growth and development.	Regulation
TC94931	1.70	2.09	TC94931 weakly similar to UP Q9LUC5 (Q9LUC5) Cytochrome P450, partial (63%)	Perception and signal transduction
TC112517	1.70	2.95	TC112517 weakly similar to UP Q9FKU3 (Q9FKU3) Receptor protein kinase-like protein, partial (16%)	Wound and pathogenesis
TC94261	1.69	3.72	TC94261 similar to UP O49821 (O49821) Glutathione transferase , partial (49%)	Wound and pathogenesis
TC109058	1.60	2.54	TC109058 similar to UP Q75WU3 (Q75WU3) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase 1, partial (18%)	Cell rescue
TC102161	1.56	2.28	TC102161 similar to UP Q9ZRB8 (Q9ZRB8) Homeobox 2 protein, partial (79%)	Wound and pathogenesis
TC108709	1.37	2.95	TC108709 similar to UP Q9ZUN4 (Q9ZUN4) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, partial (92%)	Wound and pathogenesis
TC96942	1.32	2.55	TC96942 weakly similar to UP O81865 (O81865) Lectin like protein (AT4g19840/T16H5_200), partial (9%)	Hormone synthesis
TC108379	1.32	4.12	TC108379 similar to UP Q9FQZ3 (Q9FQZ3) Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 precursor, partial (58%)	Regulation
TC95036	1.24	2.28	TC95036 similar to UP Q93WQ0 (Q93WQ0) Subtilisin-type protease, partial (92%); serine protease	Cell wall related
TC94973	1.22	0.41	TC94973 similar to UP Q8H0D9 (Q8H0D9) Alcohol dehydrogenase, partial (87%); Carbohydrate Metabolism; Glycolysis / Gluconeogenesis	Secondary metabolism
BG647378	1.19	2.49	BG647378 similar to UP LBD1_ARATH (Q9LQR0) LOB domain protein 1, partial (61%)	Cell rescue
TC94560	1.15	0.50	TC94560 weakly similar to UP Q9LW69 (Q9LW69) Peptide/amino acid transporter-like protein, partial (47%)	Hormone synthesis
TC94310	1.14	0.40	TC94310 weakly similar to UP Q05929 (Q05929) EDGP precursor (Fragment), partial (73%); dermal glycoprotein	Dormancy
TC106654	1.14	2.47	TC106654 homologue to UP Q9XER2 (Q9XER2) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase , complete	Wound and pathogenesis
TC101636	1.10	2.24	TC101636 weakly similar to UP Q6R077 (Q6R077) MYB transcription factor, partial (36%)	Energy production

Table 2 (continued)

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC104892	1.09	0.34	TC104892 similar to UP SUT1_STYHA (P53391) High affinity sulphate transporter 1, partial (24%); Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in indian mustard affects metal tolerance and accumulation	Wound and pathogenesis
TC100982	1.04	0.48	TC100982 similar to UP O24292 (O24292) CP12 precursor, partial (53%); CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein; specific interaction between CP12 and chloroplast GAPDH	Wound and pathogenesis
TC97138	1.00	0.37	TC97138 weakly similar to UP EPA5_HUMAN (P54756) Ephrin type-A receptor 5 precursor (Tyrosine-protein kinase receptor); partial (3%)	Perception and signal transduction
TC104576	0.93	2.33	TC104576 weakly similar to (Q6L3Y2) Putative late blight resistance protein, partial (1%)	Cell wall related
TC100777	0.92	2.24	TC100777 similar to UP P93166 (P93166) SCOF-1, partial (53%); cold-inducible zinc finger protein, enhances cold tolerance	Protein synth. growth and dev.
TC106731	0.92	0.40	TC106731 pectin methylesterase 5 [ <i>Medicago truncatula</i> ]	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC100141	0.85	0.41	TC100141 similar to UP O24320 (O24320) Lipoxygenase, partial (93%)	Wound and pathogenesis
TC107927	0.84	0.38	TC107927 similar to UP O53022 (O53022) Fused-ccdB protein, partial (26%); DNA replication	Wound and pathogenesis
TC100479	0.82	0.43	TC100479 similar to UP Q8H8B6 (Q8H8B6) Putative subtilisin-like serine protease, partial (21%); serine endopeptidase	Cell rescue
TC109255	0.80	0.41	TC109255 similar to UP Q7XZD0 (Q7XZD0) Isoflavonoid glucosyltransferase, partial (47%)	Regulation
TC106943	0.78	0.43	TC106943 similar to UP GTX6_SOYBN (P32110) Probable glutathione S-transferase (Heat shock protein 26A) (G2-4) , complete	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC107058	0.73	0.42	TC107058 weakly similar to UP Q9LSW7 (Q9LSW7) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (AT5g43440/MWF20_15), partial (41%)	Hormone synthesis
TC108500	0.70	0.38	TC108500 similar to UP Q8LLR3 (Q8LLR3) Ethylene-responsive element binding protein 1, partial (46%)	Cell rescue
TC107168	0.69	0.44	TC107168 weakly similar to UP Q8W414 (Q8W414) S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid calboxyl methyltransferase- plant defence protein	Perception and signal transduction
TC106721	0.67	0.38	TC106721 similar to UP Q8GTE5 (Q8GTE5) Transcription factor EREBP-like protein (Fragment), partial (95%); An Interaction between a MYC Protein and an EREBP Protein Is Involved in Transcriptional Regulation of the Rice Wx (amylose) Gene	Secondary metabolism
TC111188	0.66	0.43	TC111188 weakly similar to UP Q9SML3 (Q9SML3) Cytochrome P450 monooxygenase (Fragment), partial (49%)	Cell rescue
TC95689	0.66	0.47	TC95689 weakly similar to UP Q8GT67 (Q8GT67) Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein, partial (28%)	Protein synth. growth and dev.
TC96117	0.66	0.34	TC96117 similar to UP Q9ZP87 (Q9ZP87) Epoxide hydrolase, partial (82%); functions in detoxication during drug metabolism.	Perception and signal transduction
TC107481	0.62	0.43	TC107481 similar to UP CP22_HORVU (P55748) Serine carboxypeptidase II-2 precursor (CP-MII.2) (Fragment) , partial (70%)	Perception and signal transduction
TC106322	0.59	0.24	TC106322 similar to UP Q9M3Y4 (Q9M3Y4) Germin-like protein, partial (94%)	Protein synth. growth and dev.
TC101506	0.57	0.48	TC101506 similar to UP Q66MH6 (Q66MH6) MAPKK, partial (64%)	Cell rescue
TC107655	0.54	0.46	TC107655 weakly similar to UP Q8GT67 (Q8GT67) Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein, partial (75%)	Wound and pathogenesis
TC100746	0.53	0.45	TC100746 UP O24080 (O24080) Peroxidase2 precursor , complete	Wound and pathogenesis
TC108608	0.48	0.47	TC108608 similar to UP Q8GSL0 (Q8GSL0) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, partial (98%); protein-serine/threonine kinase; Ca2+/calmodulin-regulated group of protein kinases; glycolysis - gluconeogenesis	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC102237	0.46	0.85	TC102237 similar to UP Q708X5 (Q708X5) Leucine rich repeat protein precursor, partial (98%)	Cell rescue
TC103846	0.44	0.30	TC103846 similar to UP CP22_HORVU (P55748) Serine carboxypeptidase II-2 precursor (CP-MII.2) (Fragment) , partial (32%)	Cell rescue
TC107148	0.44	0.62	TC107148 similar to UP Q8GTL6 (Q8GTL6) High molecular weight root vegetative storage protein precursor (Fragment), partial (97%)	Wound and pathogenesis
TC94230	0.42	0.41	TC94230 similar to UP Q8S3J3 (Q8S3J3) Hydroxyisourate hydrolase, partial (78%)	Lipid metabolism
TC101755	0.37	0.25	TC101755 similar to UP Q8S9A4 (Q8S9A4) Glucosyltransferase-5, partial (52%)	Dormancy
TC108120	0.35	0.29	TC108120 similar to UP Q9LVH6 (Q9LVH6) Aldose 1-epimerase-like protein, partial (95%)	Wound and pathogenesis
TC107784	0.30	0.36	TC107784 similar to UP Q84P43 (Q84P43) Protein kinase Pti1, partial (45%)	Wound and pathogenesis
TC103648	0.27	0.34	TC103648 weakly similar to UP Q9SD64 (Q9SD64) Receptor kinase-like protein, partial (10%)	Cell rescue
TC107305	0.18	0.22	TC107305 similar to UP Q9AU00 (Q9AU00) Phosphate transporter 2, partial (12%)	Wound and pathogenesis
TC105665	0.15	0.23	TC105665 weakly similar to UP Q6NMB7 (Q6NMB7) At1g43650 (Nodulin-like protein), partial (40%)	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC103486	0.14	0.19	TC103486 similar to UP Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F611.30/F611.30) (At1g17020/F611.30), partial (59%); Non-protein-coding RNA that regulates the transcription of SER3; expression of SRG1 RNA represses expression of its neighboring gene SER3	Wound and pathogenesis
TC111470	0.05	0.05	TC111470 homologue to UP Q8H9C0 (Q8H9C0) Elongation factor 1-alpha, partial (82%)	Perception and signal transduction
TC95219	0.03	0.03	TC95219 similar to UP Q41680 (Q41680) Narbonin, partial (9%); storage protein	Regulation

Table 3. Statistics and functional repartition of potential cold-regulated candidate genes within freezing tolerance QTL intervals on *M. truncatula* LG1, LG4 and LG6.

Size of considered zone (cM) Number of genes regulated	LG1		LG4		LG6	
	26		17		7	
Functional groups of candidate genes	59		84		19	
	up-regulated	down-regulated	up-regulated	down-regulated	up-regulated	down-regulated
Perception & signal transduction	4	2	1	1	0	1
Regulation	3	1	8	0	0	0
Cold-induced & dehydrationrelated	0	0	1	0	0	0
Energy production	2	2	2	2	0	1
Cryoprotective sugars & amino acid synthesis	2	6	3	2	0	1
Dormancy	2	2	2	1	2	1
Cell wall-related	1	1	1	5	1	0
Lipid metabolism	1	1	2	2	0	0
Hormone synthesis	0	0	2	1	0	0
secondary metabolism	1	3	3	5	0	2
Protein synthesis, growth & development	4	3	4	2	1	0
Cell rescue	2	2	3	4	1	2
Wound & pathogenesis responses	2	7	4	6	0	6

Using an expression ratio cut-off of 3-fold, 15 genes were retrieved as highly expressed at EA or LA (Table 4).

Table 4. LG1 highly expressed genes at the beginning and the end of the acclimation phase (EA & LA). Only genes whose expression ratio was  $\geq 3$  fold at either stage were retained.

DFCI MtG18 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtG1 tentative Annotation	Functional categories
TC96463	7.30	7.92	TC96463 weakly similar to UP Q9FYT2 (Q9FYT2) Stellacyanin-like protein CASLP1 precursor, partial (34%); A gene encoding stellacyanin is induced in <i>Capsicum annuum</i> by pathogens, methyl jasmonate, abscisic acid, wounding, drought and salt stress	Wound and pathogenesis
TC95760	6.41	2.29	TC95760 homologue to UP Q9SC38 (Q9SC38) Germin-like protein (Fragment), partial (39%)	Wound and pathogenesis
TC108447	5.75	3.99	TC108447 weakly similar to UP Q6T1D0 (Q6T1D0) Peroxidase precursor, partial (39%)	Cell rescue
TC101001	4.60	2.30	TC101001 weakly similar to UP Q41679 (Q41679) Narbonin (Fragment), partial (71%); storage protein	Cell rescue
TC96570	4.27	3.30	TC96570 weakly similar to UP Q6A174 (Q6A174) Copper/topa quinone amine oxidase (Fragment) . partial (45%); nitrogen metabolism	Secondary metabolism
TC100171	3.20	1.34	TC100171 similar to UP O24470 (O24470) Lipoxygenase , complete	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC101879	3.02	2.38	TC101879 weakly similar to UP Q8LA24 (Q8LA24) Replication protein A1-like, partial (18%)	Regulation
TC100686	3.01	2.67	TC100686 similar to (Q8LGC3) Putative disease resistance protein, partial (88%) defense response	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC97943	2.93	3.42	TC97943 similar to UP Q5RM57 (Q5RM57) Drought responsive element binding protein, partial (50%)	Cell wall related
TC100303	2.83	3.00	TC100303 similar to UP Q43626 (Q43626) Vicilin 47kD protein, partial (96%) seed storage protein of legumes.	Wound and pathogenesis
TC101546	2.50	3.44	TC101546 weakly similar to UP Q6VAB3 (Q6VAB3) UDP-glycosyltransferase 85A8, partial (66%); Q6VAB3 transferase activity, transferring hexosyl groups, glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides	Wound and pathogenesis
TC107863	2.26	3.12	TC107863 weakly similar to UP Q41695 (Q41695) Pectinacetyltransferase precursor , partial (89%)	Protein synth. growth and dev.
TC106760	2.22	3.53	TC106760 similar to UP Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F611.30/F611.30) (At1g17020/F611.30), partial (33%); oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor	Dormancy
TC94261	1.69	3.72	TC94261 similar to UP O49821 (O49821) Glutathione transferase , partial (49%)	Wound and pathogenesis
TC108379	1.32	4.12	TC108379 similar to UP Q9FQZ3 (Q9FQZ3) Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 precursor, partial (58%)	Lipid metabolism

### ***Genes mapping in the QTL interval of LG4***

Only one marker of the LR3 LG4 was anchored to the UMN integrated genetic-physical map. A zone of 17 cM below this marker on the UMN map at the lower arm end, according to the QTLs positions on the LR3 map was considered for candidate genes research (figure 5). This interval contained a contig of 200 BACs. Out of the 400 differentially expressed genes obtained from the transcriptomic analysis, 80 were found within this zone, embedded in 116 BACs (Table 5).

UMN map-LG4

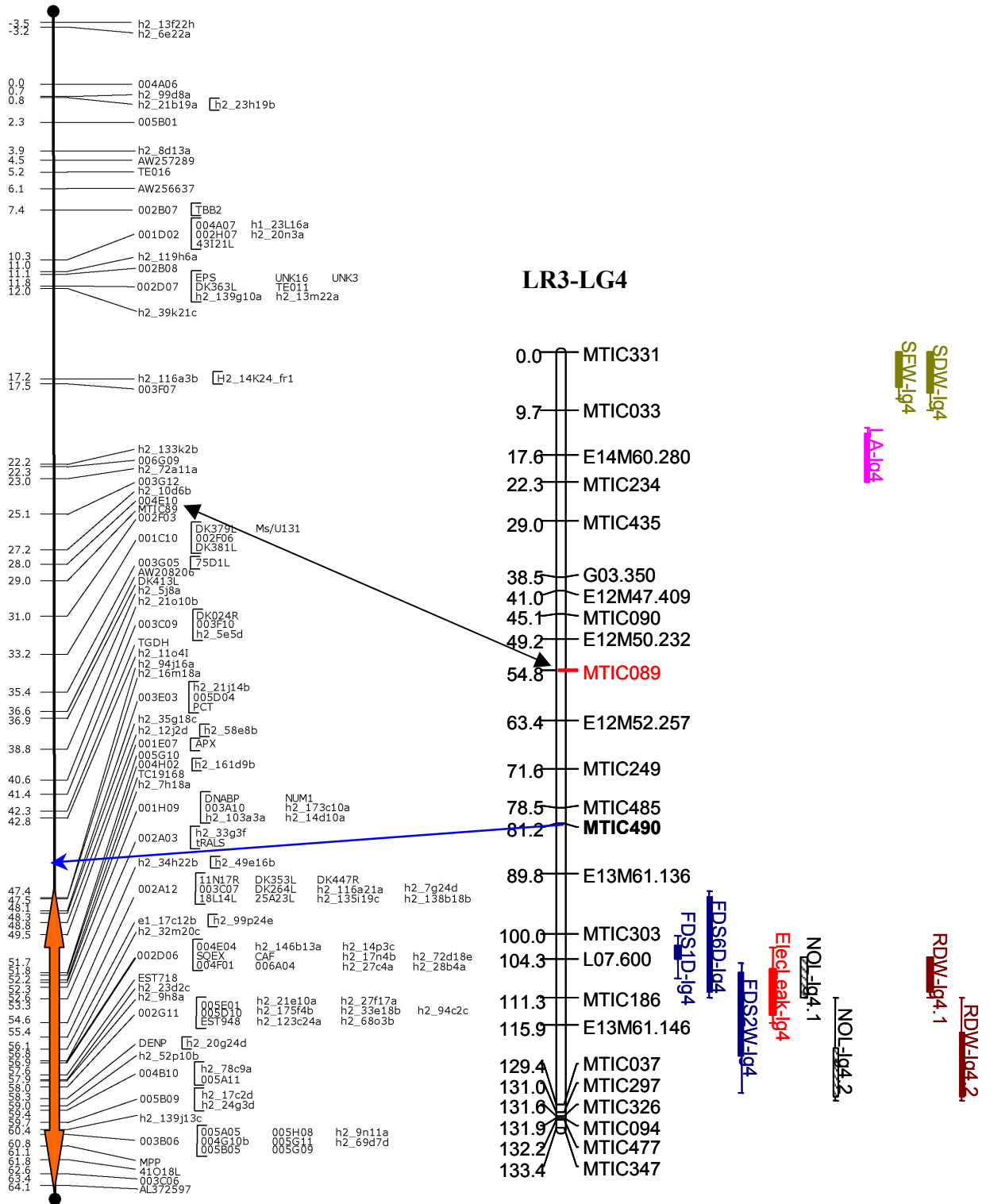


Figure 5. *M. truncatula* LR3 LG4 genetic map and freezing related QTLs. Marker in red is common with one genetic marker (shown by the black arrow) on the integrated UMN map and marker in bold is not mapped on the UMN map but is anchored to a sequenced BAC of the Mt2.0, its approximate position shown by the blue arrow. An interval of 17 cM (orange arrow) on the LG4 of the UMN map was considered for candidate genes research. See Table 1 for traits description.

Table 5. Differentially expressed genes from transcriptomic analysis localizing in the 17cM zone on LG4 of the UMN-map as shown in fig. 4. For each gene, TIGR *M. truncatula* genbank ID and gene prediction as of MTGI8 are shown along with gene expression ratio mean after one day (M\_EA) and after 14 days (M\_LA) under acclimation conditions.

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC97907	7.63	6.40	TC97907 UP LEC1_MEDTR (Q01806) Lectin 1 precursor, complete; toxic glycoprotein	Protein synth. growth and dev.
TC106617	6.26	5.75	TC106617 homologue to PIR T06431 T06431 ribosomal protein L27-5 - garden pea ( <i>Pisum sativum</i> ), complete	Dormancy
TC108447	5.75	3.99	TC108447 weakly similar to UP Q6T1D0 (Q6T1D0) Peroxidase precursor, partial (39%)	Secondary metabolism
TC95357	4.49	2.61	TC95357 homologue to UP Q39889 (Q39889) Heat shock protein , partial (53%)	Secondary metabolism
TC100350	4.46	4.00	TC100350 weakly similar to (Q6L3S8) Putative F-Box protein, partial (11%); mediates ubiquitination of proteins targeted for degradation by the proteasome	Wound and pathogenesis
TC98216	4.03	3.93	TC98216 homologue to UP Q41399 (Q41399) Chalcone reductase, partial (69%) first step of the flavonoid pathway	Secondary metabolism
TC100155	3.74	1.45	TC100155 homologue to UP O24470 (O24470) Lipoxygenase , complete	Perception and signal transduction
TC96658	3.70	1.36	TC96658 similar to UP XT22_ARATH (Q38857) Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 precursor (At-XTH22) (XTH-22) (Touch protein 4) , partial (44%)	Wound and pathogenesis
TC111316	3.42	3.65	TC111316 weakly similar to UP Q9LQ75 (Q9LQ75) T1N6.22 protein, partial (64%); Q9LQ75 Belongs to the short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) famil, oxidoreductase activity	Perception and signal transduction
TC100317	3.34	1.30	TC100317 similar to UP Q6T706 (Q6T706) Plastidic aldolase, partial (16%)	Secondary metabolism
BG646875	3.20	3.22	BG646875 similar to UP Q8GUJ6 (Q8GUJ6) NAM / CUC2-like protein (At4g28530), partial (42%)	Cell wall related
TC100686	3.01	2.67	TC100686 similar to (Q8LGC3) Putative disease resistance protein, partial (88%) defense response	Protein synth. growth and dev.
TC94011	2.92	2.71	TC94011 similar to UP O82161 (O82161) Phi-1 protein, partial (79%)	Wound and pathogenesis
TC98367	2.82	2.52	TC98367 UP PR1_MEDTR (Q40374) Pathogenesis-related protein PR-1 precursor, partial (92%)	Wound and pathogenesis
TC94133	2.80	2.57	TC94133 homologue to UP Q70I32 (Q70I32) Transcription factor homolog BTF3-like protein, partial (95%)	Cell wall related
TC101546	2.50	3.44	TC101546 weakly similar to UP Q6VAB3 (Q6VAB3) UDP-glycosyltransferase 85A8, partial (66%); Q6VAB3 transferase activity, transferring hexosyl groups, glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC102853	2.44	1.81	TC102853 similar to UP WR23_ARATH (O22900) Probable WRKY transcription factor 23 (WRKY DNA-binding protein 23), partial (41%)	Protein synth. growth and dev.
TC109314	2.28	2.66	TC109314 weakly similar to UP Q84V18 (Q84V18) Beta-ketoacyl-CoA-synthase, partial (24%)	Wound and pathogenesis
AJ501814	2.26	1.79	AJ501814 similar to PIR G71407 G71407 transcription factor, CCAAT-binding, chain A - Arabidopsis thaliana, partial (58%)	Perception and signal transduction
TC106760	2.22	3.53	TC106760 similar to UP Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F6I1.30/F6I1.30) (At1g17020/F6I1.30), partial (33%); oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor	Wound and pathogenesis
TC106401	2.20	2.32	TC106401 weakly similar to UP Q8L5K8 (Q8L5K8) Orcinol O-methyltransferase , partial (65%)	Cell rescue
TC108864	2.18	2.37	TC108864 similar to UP Q9LK64 (Q9LK64) Multidrug resistance-associated protein (MRP); ABC-transporter, partial (26%)	Hormone synthesis
TC106479	2.15	1.58	TC106479 homologue to UP O04919 (O04919) Lipoxygenase , complete	Hormone synthesis
TC96074	2.12	2.08	TC96074 similar to UP Q9LHL3 (Q9LHL3) RNA-binding protein-like, partial (11%)	Secondary metabolism
TC95065	2.03	2.24	TC95065 similar to UP Q5XEP9 (Q5XEP9) At1g04220, partial (66%); Q5XEP9 3-ketoacyl-CoA synthase 17, Very long-chain fatty acid condensing enzyme 17, Fatty acid biosynthesis	Lipid metabolism
TC101285	2.00	2.25	TC101285 similar to PIR T05166 T05166 quinone reductase homolog F18E5.200 - Arabidopsis thaliana, partial (96%)	Cell rescue
TC99871	1.97	2.04	TC99871 weakly similar to UP Q8L5W2 (Q8L5W2) bZIP transcription factor ATB2, partial (59%); light- and sucrose-regulated bZIP transcription factor	Wound and pathogenesis
TC103553	1.84	3.11	TC103553 weakly similar to UP Q9LY71 (Q9LY71) Cytokinin oxidase-like protein, partial (45%)	Cold induced and dehydration related
TC95289	1.83	4.96	TC95289 weakly similar to UP Q9AXG2 (Q9AXG2) Regulator of gene silencing, partial (42%)	Secondary metabolism
TC100609	1.80	2.31	TC100609 similar to UP Q94I3 (Q94I3) ERD3 protein, partial (88%); early-response-to-drought-3	Regulation
TC94931	1.70	2.09	TC94931 weakly similar to UP Q9LUC5 (Q9LUC5) Cytochrome P450, partial (63%)	Lipid metabolism
TC94261	1.69	3.72	TC94261 similar to UP O49821 (O49821) Glutathione transferase , partial (49%)	Cell rescue
TC109058	1.60	2.54	TC109058 similar to UP Q75WU3 (Q75WU3) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase 1, partial (18%)	Lipid metabolism
TC98014	1.39	2.08	TC98014 homologue to UP Q9SVY1 (Q9SVY1) Zinc finger-like protein (WIP2 protein), partial (50%)	Cell wall related
TC103227	1.34	3.31	TC103227 similar to UP HMG2_RAT (P52925) High mobility group protein 2 (HMG-2), partial (6%)	Cell rescue
TC96942	1.32	2.55	TC96942 weakly similar to UP O81865 (O81865) Lectin like protein (AT4g19840/T16H5_200), partial (9%)	Regulation



Table 5 (continued)

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC108379	1.32	4.12	TC108379 similar to UP Q9FQZ3 (Q9FQZ3) Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 precursor, partial (58%)	Regulation
TC100486	1.29	0.50	TC100486 similar to UP BRU1_SOYBN (P35694) Brassinosteroid-regulated protein BRU1 precursor, partial (92%)	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC101649	1.25	2.40	TC101649 weakly similar to UP Q6XBF8 (Q6XBF8) CDR1, partial (35%); mitotic control; cdr1 protein kinase is required for an efficient adaptation of cell cycle parameters to changes in nutritional conditions.	Regulation
TC95036	1.24	2.28	TC95036 similar to UP Q93WQ0 (Q93WQ0) Subtilisin-type protease, partial (92%); serine protease	Cell rescue
TC94973	1.22	0.41	TC94973 similar to UP Q8H0D9 (Q8H0D9) Alcohol dehydrogenase, partial (87%); Carbohydrate Metabolism; Glycolysis / Gluconeogenesis	Wound and pathogenesis
BG647378	1.19	2.49	BG647378 similar to UP LBD1_ARATH (Q9LQR0) LOB domain protein 1, partial (61%)	Protein synth. growth and dev.
TC94560	1.15	0.50	TC94560 weakly similar to UP Q9LW69 (Q9LW69) Peptide/amino acid transporter-like protein, partial (47%)	Cell wall related
TC94875	1.10	5.62	TC94875 weakly similar to GB BAB08323.1 9757805 AB007651 CCR4-associated factor-like protein (Arabidopsis thaliana), partial (77%)	Wound and pathogenesis
TC101636	1.10	2.24	TC101636 weakly similar to UP Q6R077 (Q6R077) MYB transcription factor, partial (36%)	Wound and pathogenesis
TC97361	0.98	0.36	TC97361 similar to UP Q7XIZ1 (Q7XIZ1) Glutaredoxin-like protein, partial (40%)	Regulation
TC106731	0.92	0.40	TC106731 pectin methyltransferase 5 [Medicago truncatula]	Regulation
TC101262	0.91	5.78	TC101262 similar to UP Q8S8Z6 (Q8S8Z6) Syringolide-induced protein 13-1-1, partial (86%)	Perception and signal transduction
TC97300	0.90	0.29	TC97300 weakly similar to UP C901_ARATH (Q42569) Cytochrome P450 90A1, partial (8%)	Cell rescue
TC100141	0.85	0.41	TC100141 similar to UP O24320 (O24320) Lipoygenase, partial (93%)	Cell rescue
TC105846	0.82	0.25	TC105846 similar to UP Q75UJ6 (Q75UJ6) DREB-like protein, partial (35%)	Cold induced and dehydration related
TC110146	0.78	0.36	TC110146 weakly similar to (Q84LG7) Putative taxane 10-beta-hydroxylase(5-alpha-taxadienol-10-beta-hydroxylase), partial (27%)	Regulation
TC94491	0.74	0.32	TC94491 similar to UP TIP1_TOBAC (P21653) Probable aquaporin TIP-type RB7-5A (Tonoplast intrinsic protein, root-specific RB7-5A) (TobRB7) (RT-TIP), partial (97%)	Hormone synthesis
TC107032	0.71	0.47	TC107032 weakly similar to UP Q9ZWP4 (Q9ZWP4) Lectin-related polypeptide, partial (49%); They agglutinate cells and/or precipitates glycoconjugates.	Regulation
CX550152	0.69	0.37	CX550152 similar to UP Q9FQE6 (Q9FQE6) Glutathione S-transferase GST 12, partial (32%)	Energy production
TC98641	0.68	0.36	TC98641 similar to UP Q75W20 (Q75W20) Squalene epoxidase, partial (19%); Squalene monooxygenase (formerly squalene epoxidase) catalyzes the second committed step in cholesterol biosynthesis	Lipid metabolism
TC100929	0.68	0.23	TC100929 weakly similar to UP Q944X2 (Q944X2) 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (Fragment), partial (21%)	Regulation
AW559374	0.63	2.14	AW559374 similar to UP Q67U00 (Q67U00) Ethylene-binding protein-like, partial (31%)	Lipid metabolism
TC94435	0.63	0.42	TC94435 homologue to UP IAAE_ARATH (Q38832) Auxin-responsive protein IAA14 (Indoleacetic acid-induced protein 14) (SOLITARY-ROOT protein), partial (82%)	Cell rescue
TC106551	0.60	0.33	TC106551 homologue to UP Q43791 (Q43791) Peroxidase1C precursor, complete	Secondary metabolism
TC106322	0.59	0.24	TC106322 similar to UP Q9M3Y4 (Q9M3Y4) Germin-like protein, partial (94%)	Secondary metabolism
TC101506	0.57	0.48	TC101506 similar to UP Q66MH6 (Q66MH6) MAPKK, partial (64%)	Regulation
TC109804	0.55	0.25	TC109804 similar to UP Q43550 (Q43550) Major allergen Mal d1, partial (18%); Pathogenesis-related protein	Lipid metabolism
TC107086	0.49	0.47	TC107086 homologue to UP Q8L6F0 (Q8L6F0) Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, complete	Regulation
TC108608	0.48	0.47	TC108608 similar to UP Q8GSL0 (Q8GSL0) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, partial (98%); protein-serine/threonine kinase; Ca2+/calmodulin-regulated group of protein kinases; glycolysis - gluconeogenesis	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC108038	0.47	0.24	TC108038 similar to UP Q9ZP12 (Q9ZP12) Glucan endo-1,3-beta-d-glucosidase precursor, partial (94%)	Regulation
TC103846	0.44	0.30	TC103846 similar to UP CP22_HORVU (P55748) Serine carboxypeptidase II-2 precursor (CP-MII.2) (Fragment), partial (32%)	Wound and pathogenesis
TC103963	0.44	0.61	TC103963 similar to UP P93205 (P93205) SBT2 protein (Subtilisin-like protease), partial (32%)	Perception and signal transduction
TC94230	0.42	0.41	TC94230 similar to UP Q8S3J3 (Q8S3J3) Hydroxyisourate hydrolase, partial (78%)	Wound and pathogenesis
TC95249	0.42	0.40	TC95249 weakly similar to UP Q6K2M1 (Q6K2M1) Polygalacturonase isoenzyme 1 beta subunit-like, partial (4%)	Regulation
TC94069	0.41	0.39	TC94069 weakly similar to UP Q6AW47 (Q6AW47) Carboxylesterase-like urinary excreted protein, partial (3%); Plant Carboxylesterase are involved in Leguminous Isoflavone Biosynthesis	Cryoprotective sugars and amino acid synth.
TC102237	0.39	0.83	TC102237 similar to UP Q708X5 (Q708X5) Leucine rich repeat protein precursor, partial (98%); receptor motif	Energy production
TC100682	0.36	0.19	TC100682 similar to GB AAC36740.1 3643249 AF090143 thaumatin-like protein precursor Mdt1 (Malus x domestica), partial (89%)	Cell wall related
TC107784	0.30	0.36	TC107784 similar to UP Q84P43 (Q84P43) Protein kinase Pti1, partial (45%)	Lipid metabolism
TC98043	0.26	0.28	TC98043 similar to UP Q9ZQW2 (Q9ZQW2) Laccase, partial (42%)	Secondary metabolism
TC105665	0.15	0.23	TC105665 weakly similar to UP Q6NMB7 (Q6NMB7) At1g43650 (Nodulin-like protein), partial (40%)	Protein synth. growth and dev.
TC103486	0.14	0.19	TC103486 similar to UP Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F611.30/F611.30) (At1g17020/F611.30), partial (59%); Non-protein-coding RNA that regulates the transcription of SER3	Cell rescue
TC105899	0.11	0.11	TC105899 weakly similar to UP O65859 (O65859) O-methyltransferase, partial (27%)	Cell rescue
TC94733	0.08	0.09	TC94733 similar to UP Q9LL47 (Q9LL47) SAG101, partial (14%); SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101	Protein synth. growth and dev.
TC111470	0.05	0.05	TC111470 homologue to UP Q8H9C0 (Q8H9C0) Elongation factor 1-alpha, partial (82%)	Wound and pathogenesis

Considering a gene expression cut-off of 3-fold, 21 genes were highlighted as highly expressed either at EA or LA (Tables 6).

Table 6. LG4 highly expressed genes at EA & LA. Only genes whose expression ratio at either stage was  $\geq 3$  fold were retained.

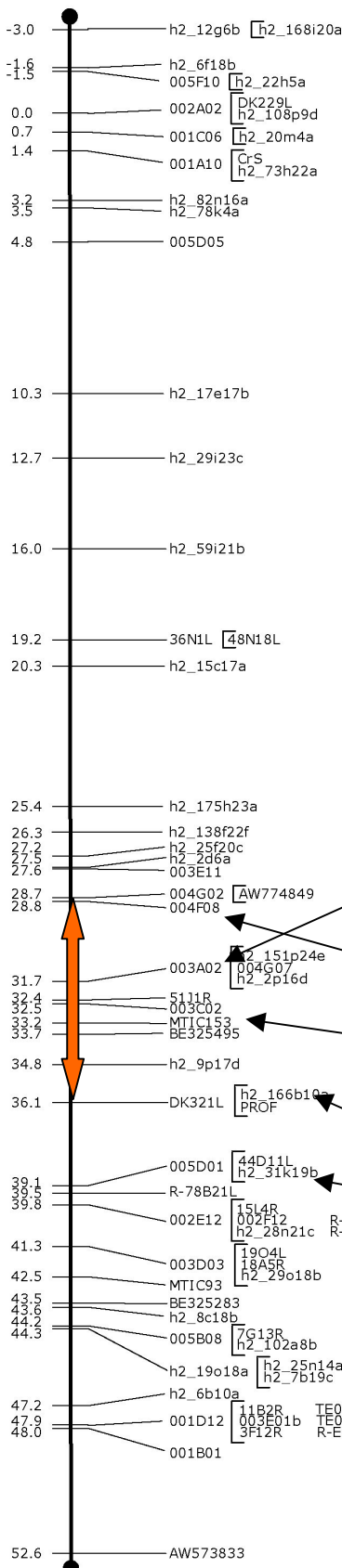
DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC97907	7.63	6.40	TC97907 UP LEC1_MEDTR (Q01806) Lectin 1 precursor, complete; toxic glycoprotein	Lipid metabolism
TC106617	6.26	5.75	TC106617 homologue to PIR T06431 T06431 ribosomal protein L27-5 - garden pea ( <i>Pisum sativum</i> ), complete	Wound and pathogenesis
TC108447	5.75	3.99	TC108447 weakly similar to UP Q6T1D0 (Q6T1D0) Peroxidase precursor, partial (39%)	Wound and pathogenesis
TC95357	4.49	2.61	TC95357 homologue to UP Q39889 (Q39889) Heat shock protein , partial (53%)	Regulation
TC100350	4.46	4.00	TC100350 weakly similar to (Q6L3S8) Putative F-Box protein, partial (11%); mediates ubiquitination of proteins targeted for degradation by the proteasome	Protein synth. growth and dev.
TC98216	4.03	3.93	TC98216 homologue to UP Q41399 (Q41399) Chalcone reductase, partial (69%) first step of the flavonoid pathway	Wound and pathogenesis
TC100155	3.74	1.45	TC100155 homologue to UP Q24470 (Q24470) Lipoxygenase , complete	Lipid metabolism
TC96658	3.70	1.36	TC96658 similar to UP XT22_ARATH (Q38857) Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 precursor (At-XTH22) (XTH-22) (Touch protein 4) , partial (44%)	Regulation
TC111316	3.42	3.65	TC111316 weakly similar to UP Q9LQ75 (Q9LQ75) T1N6.22 protein, partial (64%); Q9LQ75 Belongs to the short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) famil, oxidoreductase activity	Hormone synthesis
TC100317	3.34	1.30	TC100317 similar to UP Q6T706 (Q6T706) Plastidic aldolase, partial (16%)	Lipid metabolism
BG646875	3.20	3.22	BG646875 similar to UP Q8GUJ6 (Q8GUJ6) NAM / CUC2-like protein (At4g28530), partial (42%)	Regulation
TC100686	3.01	2.67	TC100686 similar to (Q8LGC3) Putative disease resistance protein, partial (88%) defense response	Wound and pathogenesis
TC101546	2.50	3.44	TC101546 weakly similar to UP Q6VAB3 (Q6VAB3) UDP-glycosyltransferase 85A8, partial (66%); Q6VAB3 transferase activity, transferring hexosyl groups, glycosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides	Lipid metabolism
TC106760	2.22	3.53	TC106760 similar to UP Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F611.30/F611.30) (At1g17020/F611.30), partial (33%); oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor	Secondary metabolism
TC103553	1.84	3.11	TC103553 weakly similar to UP Q9LY71 (Q9LY71) Cytokinin oxidase-like protein, partial (45%)	Cell rescue
TC95289	1.83	4.96	TC95289 weakly similar to UP Q9AXG2 (Q9AXG2) Regulator of gene silencing, partial (42%)	Protein synth. growth and dev.
TC94261	1.69	3.72	TC94261 similar to UP Q49821 (Q49821) Glutathione transferase , partial (49%)	Cell wall related
TC103227	1.34	3.31	TC103227 similar to UP HMG2_RAT (P52925) High mobility group protein 2 (HMG-2), partial (6%)	Protein synth. growth and dev.
TC108379	1.32	4.12	TC108379 similar to UP Q9FQZ3 (Q9FQZ3) Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 precursor, partial (58%)	Hormone synthesis
TC94875	1.10	5.62	TC94875 weakly similar to GB BAB08323.1 9757805 AB007651 CCR4-associated factor-like protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ); , partial (77%)	Regulation
TC101262	0.91	5.78	TC101262 similar to UP Q8S8Z6 (Q8S8Z6) Syringolide-induced protein 13-1-1, partial (86%)	Lipid metabolism

### *Genes mapping in QTL interval of LG6*

Four markers of the LR3 LG6 were anchored to the UMN integrated genetic-physical map. An interval of 7 cM on the UMN map, between markers 004F08 and h2\_166b10a was considered for candidate genes search. Most of the important QTLs (e.g. FDS2W, ElecLeak, RDW and CC) were located within this interval (figure 6). We detected a contig of 19 BACs encompassing 16 genes from 16 of these 19 BACs, underlying the QTL interval (Table 7). See Table 3 for their details.

Figure 6. *M. truncatula* LR3 LG6 genetic map and freezing related QTLs. Markers in red are common with genetic markers (shown by black arrows) on the UMN map and markers in bold are anchored to sequenced BACs of the Mt2.0. An interval of 7 cM (orange arrow) on the LG6 of the UMN map was considered for candidate genes research. See Table 1 for traits description.

### UMN map-LG6



### LR3-LG6

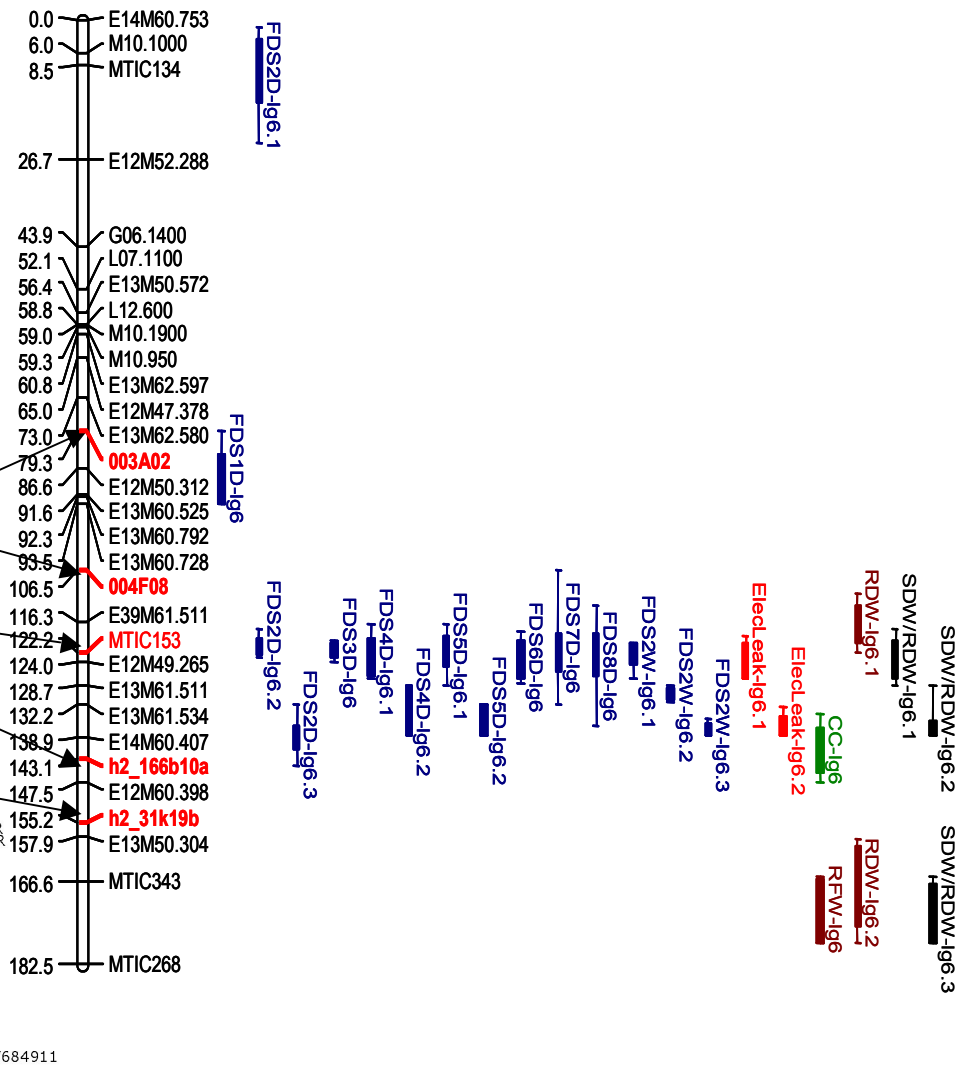


Table 7. Differentially expressed genes from transcriptomic analysis localizing in the 7 cM interval on LG6 of the UMN-map as shown in fig. 4. For each gene, TIGR *M. truncatula* genbank ID and gene prediction as of MTGI8 are shown along with gene expression ratio mean after one day (M\_EA) and after 14 days (M\_LA) under acclimation conditions.

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC109831	14.27	10.73	TC109831 similar to UP CHIT_PETHY (P29021) Acidic endochitinase precursor , partial (7%)	Dormancy
TC109895	4.66	5.51	TC109895 similar to UP Q6UEJ1 (Q6UEJ1) Ripening-related protein, partial (31%)	Perception and signal transduction
TC94509	3.33	4.96	TC94509 similar to UP Q9FNW7 (Q9FNW7) Seed maturation protein LEA 4, partial (50%)	Perception and signal transduction
TC100686	3.01	2.67	TC100686 similar to (Q8LGC3) Putative disease resistance protein, partial (88%) defense response	Wound and pathogenesis
TC100135	2.24	0.80	TC100135 homologue to UP O81391 (O81391) Chlorophyll a/b binding protein, partial (80%)	Wound and pathogenesis
TC112517	1.70	2.95	TC112517 weakly similar to UP Q9FKU3 (Q9FKU3) Receptor protein kinase-like protein, partial (16%)	Wound and pathogenesis
TC100307	1.49	4.46	TC100307 similar to UP Q68RU8 (Q68RU8) Ycf1 protein, partial (27%) Vacuolar glutathione S-conjugate transporter of the ATP-binding cassette family, has a role in detoxifying metals such as cadmium, mercury, and arsenite	Secondary metabolism
TC95036	1.24	2.28	TC95036 similar to UP Q93WQ0 (Q93WQ0) Subtilisin-type protease, partial (92%); serine protease	Regulation
TC101636	1.10	2.24	TC101636 weakly similar to UP Q6R077 (Q6R077) MYB transcription factor, partial (36%)	Wound and pathogenesis
TC95416	0.96	0.35	TC95416 weakly similar to UP Q84NC9 (Q84NC9) Myrcene synthase 1e20, partial (14%)	Cell rescue
TC101124	0.58	0.20	TC101124 weakly similar to GB BAB03049.1 9294683 AP001305 syringomycin biosynthesis enzyme-like protein {Arabidopsis thaliana;} , partial (24%)	Perception and signal transduction
TC94417	0.57	0.23	TC94417 similar to UP N12B_PEA (Q00665) Early nodulin 12B precursor (N-12B), partial (26%)	Energy production
TC102107	0.46	0.17	TC102107 similar to UP Q9M3Z8 (Q9M3Z8) Trypsin protein inhibitor 1, partial (78%)	Wound and pathogenesis
TC102237	0.39	0.83	TC102237 similar to UP Q708X5 (Q708X5) Leucine rich repeat protein precursor, partial (98%)	Dormancy
TC103648	0.27	0.34	TC103648 weakly similar to UP Q9SD64 (Q9SD64) Receptor kinase-like protein, partial (10%)	Dormancy
TC94733	0.08	0.09	TC94733 similar to UP Q9LL47 (Q9LL47) SAG101, partial (14%); SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101	Cell wall related

Using a 3-fold gene expression cut-off, 5 genes were found highly expressed (Table 8).

Table 8. LG6 highly expressed genes at the end of the acclimation phase (LA). Only genes whose expression ratio at LA was  $\geq 3$  fold are presented.

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories
TC109831	14.27	10.73	TC109831 similar to UP CHIT_PETHY (P29021) Acidic endochitinase precursor , partial (7%)	Wound and pathogenesis
TC109895	4.66	5.51	TC109895 similar to UP Q6UEJ1 (Q6UEJ1) Ripening-related protein, partial (31%)	Wound and pathogenesis
TC94509	3.33	4.96	TC94509 similar to UP Q9FNW7 (Q9FNW7) Seed maturation protein LEA 4, partial (50%)	Dormancy
TC100686	3.01	2.67	TC100686 similar to (Q8LGC3) Putative disease resistance protein, partial (88%) defense response	Wound and pathogenesis
TC100307	1.49	4.46	TC100307 similar to UP Q68RU8 (Q68RU8) Ycf1 protein, partial (27%) Vacuolar glutathione S-conjugate transporter of the ATP-binding cassette family, has a role in detoxifying metals such as cadmium, mercury, and arsenite	Energy production

***Cold perception and regulation mechanisms in Medicago truncatula cold tolerant plants***

Microfilament rearrangements, Ca<sup>2+</sup> sensors, ion channels, receptors, and signal transducers were differentially expressed between the two parents (Figure 3A). Cold perception involved almost 7% of registered expressed genes in the tolerant plants and was predominantly early induced. Regulation processes (Figure 3B) as chromatin remodeling by high mobility group HMG1 together with *A. thaliana* related cold-induced transcription factor *CBF1* were registered early engaged in the response. A DREB protein (TC95896) was found late activated and another DREB-like protein (TC105846) was found late repressed during the acclimation phase. Both genes are similar to *A. thaliana* ethylene responsive transcription factor, with complete similarity for the first one.

Transcription factors involved in glucose metabolism regulation (*ATB2* and *CCR4-associated factor*), defense (*WRKY 23*, *WRKY 32* and *WRKY 51*) and development regulation (*SHOOT1*, *MADS27*, NAM/CUC2 - like protein, *VAAMANA*, AS2 (LOB domain protein 1), homeobox 2 protein, Myb family transcription factors, TCP family transcription factor, *AP2/ERF*, EREBP-like protein, *FPP1*) were found also differentially expressed, thus possibly involved in the acclimation response.

A significant regulation was registered for RNA synthesis and regulation (RNA polymerase I small specific subunit Rpa12, ribonuclease HIII, RNA-binding protein-like, SRG1 transcription-interference mechanism, mRNA capping enzyme-like protein) together with other transcription factors undefined with general or specific annotations. Protein activity and transcription regulations represent more than 10% of registered differentially expressed genes.

***Highest fold induced genes***

Considering a fold  $\geq 10$  at either EA or LA, 12 genes were detected as highly expressed during the acclimation phase, suggesting their involvement in the cold response in *Medicago truncatula* (Table 9). They are related to signal transduction, transcription processes, glycolysis, late embryogenesis, organ specific protein, metal tolerance, energy production, cell defense, cold acclimation and lipid transport. Among them only one was located within one of the three QTL intervals retained: an endochitinase (TC109831) locating within the QTL interval on LG6. The tentative consensus BG452670 is related to a *Cold Acclimation Response (CAR)*, Haagensohn et al., 2003) gene that is induced to a very high level in alfalfa (*Medicago sativa*) during cold acclimation. Its homologous found in *M.*

*truncatula* (Pennycooke et al., 2008) was localized on LG7 in the sequenced BAC AC126009.

Table 9. Highest fold ( $\geq 10$ ) induced genes from the transcriptomic analysis either at EA or LA. The genes are presented along with their functional categories as well as the LG containing them.

DFCI MtGI8 GenBank ID	M_EA	M_LA	DFCI MtGI tentative Annotation	Functional categories	LG
TC98193	23.10	30.84	TC98193 weakly similar to UP Q9AT39 (Q9AT39) SHOOT1 protein, partial (8%) Protein binding and membrane location; protein-tyrosine phosphatase. Signaling. Signal transduction	Regulation	8
TC100365	34.42	29.95	TC100365 similar to UP Q9P1U0 (Q9P1U0) Transcription-associated zinc ribbon protein (Nuclear RNA polymerase I small specific subunit Rpa12) (Zinc ribbon domain containing, 1) (ZNRD1 protein), partial (23%)	Cryoprotective sugars and amino acid synth.	3
BF633401	17.94	26.49	BF633401 weakly similar to UP PGK_AGABI (O94123) Phosphoglycerate kinase , partial (5%)	Cryoprotective sugars and amino acid synth.	7
TC94508	12.31	22.06	TC94508 similar to UP Q9FDY1 (Q9FDY1) Seed maturation protein LEA 4, partial (45%)	Perception and signal transduction	7
TC103130	15.34	17.94	TC103130 weakly similar to GB CAA66109.3 48426429 CANST2PRO specific tissue protein 2 (Cicer arietinum), partial (59%); early DMBQ-induced transcript (allelopathic quinone 2,6-dimethoxybenzoquinone); quinone synthesis	Perception and signal transduction	3
TC106694	10.05	11.73	TC106694 similar to UP O24482 (O24482) Sali3-2, partial (89%); found in Aluminum Tolerance in Soybean	Cell rescue	2
AL374941	10.74	11.49	AL374941 similar to UniRef100_Q15GB5 Cluster: 60S ribosomal protein 23; n=1; Rhodomonas salina Rep: 60S ribosomal protein 23; partial 33%	Protein synth. growth and dev.	5
TC98429	9.43	11.21	TC98429 weakly similar to (Q9SDL9) Putative ABA-induced guard cell protein, partial (37%)	Regulation	2
TC109831	14.27	10.73	TC109831 similar to UP CHIT_PETHY (P29021) Acidic endochitinase precursor, partial (7%)	Wound and pathogenesis	6
BG452670	5.06	10.44	BG452670 UP O81392 (O81392) Cold acclimation responsive protein CAR1, partial (21%)	Cold induced and dehydration related	7
TC95558	8.26	10.09	TC95558 similar to GB AAF65569.1 7644394 AF251079 heptacellular carcinoma novel gene-3 protein (Homo sapiens), partial (3%)	Regulation	2
TC93922	22.88	9.97	TC93922 similar to UP NLTP_CICAR (O23758) Nonspecific lipid-transfer protein precursor (LTP), complete	Perception and signal transduction	4

The search for *A. thaliana* different *COR* genes, *AtLTI78*, *AtKINI*, barley different *DHN*, wheat *COR15* and *WCS120*, soybean *P5C5*, antifreeze proteins (chitinase, beta-1,3-glucanase, thaumatin-like), *LEA* and *ABA-induced* genes against the Mt2.0 did not reveal additional putative cold induced genes. The BLAST search for the *MtCBF 1 to 3* (Pennycooke et al., 2008) retrieved two BACs (each containing the 3 genes), one on LG3 (AC146573) and the second one on LG1 (AC202516). The latter BAC AC146573 on the LG1 was located within the retained QTL interval. Furthermore, analysis of the annotated BACs within the LG1 QTG interval revealed that *Gigantea (GI)* was located in the BAC AC148397, yet no transcript of the gene was detected. GI is a large nuclear protein with circadian-clock, red-light signaling and photoperiodic flowering function that have been reported as involved in cold stress in *A. thaliana* (Cao et al., 2005; Cao et al., 2007).

## DISCUSSION

Using the Mt16kOLI1plus microarrays, we undertook a simplified transcriptomic analysis by comparing samples from F 83005-5 tolerant parental line vs. DZA 045-5 parental sensitive line after 1 day and after 14 days under acclimating conditions. The dynamic development of low temperature tolerance has been extensively characterized in different species, showing that this tolerance is most rapid during the first 14 days of cold acclimation (Fowler et al., 1996b; Prasil et al., 2004). In a previous work (Avia et al., 2008), QTLs for freezing damage and related physiological traits have been mapped to a genetic linkage map obtained with a RIL population derived from the cross between the two parental lines. A few new markers were added to the map, and QTL detection was run once again in this study. Results of the transcriptomic analysis were compared to those of QTL mapping to detect possible candidate genes for cold acclimation in *M. truncatula*. The genes underlined were differentially expressed between the two parents during the cold acclimation temperature regime and located within the freezing tolerance QTL intervals, thus they are possibly involved in the freezing tolerance process of *M. truncatula*.

### *Early and late acclimation response*

Out of the 16,509 genes of the Mt16kOLI1Plus microarrays, 400 were differentially expressed during cold acclimation. These genes may then play a role in the cold acclimation process in *M. truncatula*. Among them, 202 were up-regulated and 198 down-regulated by the stress. Furthermore, 26 genes were found as early up-regulated in F 83005-5 tolerant genotype and 4 genes were found as early down-regulated. This observation suggests that the early up-regulation is possibly important for cold acclimation in F 83005-5 plants by mobilizing genes involved in the alterations of metabolisms. Only 4 genes were found early down-regulated while there were 2-fold more detected genes for the late down-regulation than the late up-regulation. There was likely an amplification of gene repression after two weeks under acclimating conditions. Several genes involved in the acclimation process and that are induced during the first days of the acclimation time course might down-regulated once their products are well established for the plant protection. The major mode of down-regulation of genes during cold acclimation might be post-transcriptional regulation (Viswanathan et al., 2007).

### *Cold perception and regulation mechanisms in Medicago truncatula cold tolerant plants*

Microfilament rearrangements,  $\text{Ca}^{2+}$  sensors, ion channels, receptors, and signal transducers were found regulated by cold in F 83005-5 plants (Figure 3A). Cold induces membrane rigidity through actin filament reorganization which may be responsible for the opening of  $\text{Ca}^{2+}$  channels of plasma membrane (Orvar et al., 2000). High mobility group (HMG or HMGB) proteins are a family of relatively low molecular weight non-histone components in chromatin. HMG1 found early activated in F 83005-5 plants together with later activated HMG2, play important architectural roles in the assembly of nucleoprotein complexes in a variety of biological processes as recombination, initiation of transcription, and DNA repair (Thomas, 2001). The C-repeat (CRT)-binding factor/dehydration-responsive element (DRE) binding protein 1 (CBF/DREB1) transcription factor is known as controlling an important pathway for increased freezing and drought tolerance in plants (Gilmour et al., 1998; Jaglo-Ottosen et al., 1998). ZPT2-14 and SCOF-1 were registered late responding. ZPT2-14 belongs to a Cys2/His2 zinc-finger protein family containing several known stress-responsive zinc finger genes as ZPT2-3 that plays a role in drought tolerance (Sugano et al., 2003). Merchan et al. (2007) when studying the regulatory pathways involved in salt stress and the reacquisition of root growth after the stress in *M. truncatula*, identified among several potential regulatory genes linked to the process, two ZPT2 transcription factors named MtZpt2-1 and MtZpt2-2. Interestingly, these two ZPT2 transcription factors were also found induced by cold stress in the roots of *M. truncatula*. The transcription of SCOF-1 is specifically induced by low temperature and abscisic acid (ABA, Kim et al., 2001). ZPT2 and SCOF-1 transcription factors were identified as positive regulators of cold-regulated (COR) gene expression and enhancing cold tolerance (Kim et al., 2001; de Lorenzo et al., 2007; Merchan et al., 2007). Our results showed that ~19% of cold-up-regulated genes encoded transcription factors, whereas only ~5% of cold-down-regulated genes encoded transcriptional regulators. This results is consistent with those obtained from transcriptome analysis in *A. thaliana* (Lee et al., 2005).

### *Cold-response of photorespiration*

Photorespiration was found early engaged and continuously promoted during cold acclimation. This event was probably determined by the strong and early activation of the ABA-induced guard cell protein as well as the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and the strong and early down-regulation of the carbonic



anhydrase (Figures 3D and 7). Rubisco is an important protein that normally accumulates in greening or photosynthetic tissues. The transcriptomic analyses have been done on root plus collar samples. Therefore, the significance of Rubisco expression in root samples remains unclear. But this might be attributed to a contamination of greening cells from the collars attached to roots samples. Furthermore, some cases of presence of Rubisco expression in non-photosynthetic organs have been reported. Tobin and Silverthorne (1985) on the one hand and Berry et al. (1990) on the other hand have reported accumulation of Rubisco mRNA in etioplasts before greening. Okubara et al. (1999) reported expression of Rubisco activase mRNA in symbiotic root nodules of *Datisca glomerata*, and postulated that this expression might be attributed to: (a) a role in photosynthesis as a minor process that occurs in some nodules; (b) a role in O<sub>2</sub> partitioning, whereby it activates the oxygenase function of Rubisco and (c) part of a general induction of cellular processes during nodule organogenesis. Root respiration is also known to be enhanced by certain microbes (Norman et al., 1994) possibly through the effects of chemical molecules they release into the rhizosphere. Studying relationship between root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates, Matiru and Dakora (2005) found that nodulating legumes seem capable of using their symbiotic trait to alleviate environmental stress. Using pea root plastids, Yan et al. (2006) showed that uptake of photosynthetic and non-photosynthetic proteins were complex and the presence of the small subunit of Rubisco in the roots may be related to chloroplasts functioning in the leaves.

Stomatal aperture regulates plant CO<sub>2</sub> intake and water loss, thus decisively influencing growth and water stress responsiveness (Mäser et al., 2003). ABA triggers a signaling cascade in guard cells that results in stomatal closure and inhibits stomatal opening (MacRobbie, 1998). The up-regulation of the ABA-induced guard cell protein found in our analysis indicates that stomatal aperture was closed and consequently, the CO<sub>2</sub> availability was limited. This kind of response to water deficit with decreased stomatal conductance and CO<sub>2</sub> assimilation has been already reported (Gollan et al., 1986; Chaves et al., 2003) but was less defined in response to cold stress.

In plants, carbonic anhydrase converts HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> to CO<sub>2</sub> (Badger and Price, 1992) being strongly implicated to facilitate the diffusion of CO<sub>2</sub> in chloroplast because the majority of inorganic carbon is bicarbonate at the alkaline pH within the stroma (Reed and Graham, 1981). Carbonic anhydrase acts to increase the CO<sub>2</sub> concentration at the site of Rubisco, the main enzyme of the light-independent reactions of photosynthesis, ensuring efficient CO<sub>2</sub> fixation (Mitra et al., 2004). The cold induced down-regulation of carbonic anhydrase in *M.*

*truncatula* was probably related to the emphasis of the CO<sub>2</sub> unavailability for carboxylation cycle.

These observations together with the up-regulation of Rubisco, explained the switch from the carboxylation cycle to photorespiration (Figure 7). Photorespiration is the alternate pathway in which Rubisco favors oxygenation instead of carbon dioxide fixation. Oxygenation of Rubisco occurs with production of phosphoglycolate and 3-phosphoglycerate and involves three cellular organelles: chloroplasts, peroxisomes, and mitochondria. During photorespiration, glycine is formed from glyoxylate in the leaf peroxisomes. The glycine enters the mitochondria, where two glycines are converted into serine (Tolbert, 1981). These processes triggering to cryoprotective amino acids synthesis were confirmed by our transcriptome data (Figures 3E and 7). On the other hand, during photorespiration the 3-phosphoglycerate is successively transformed into glucose. Our analysis showed that this way triggered to the cryoprotective sugars synthesis (Figures 3E and 7). It was observed in *Medicago sativa* that elevated CO<sub>2</sub> stimulates plant growth but reduces freezing tolerance (Bertrand et al., 2007). Our data showed that cold acclimation diminished the CO<sub>2</sub> fixation and induced the photorespiration which triggered metabolic changes necessary for cold resistance. Considering the precocity of these processes, we can admit that this behavior was not a consequence but a necessity for cold acclimation.

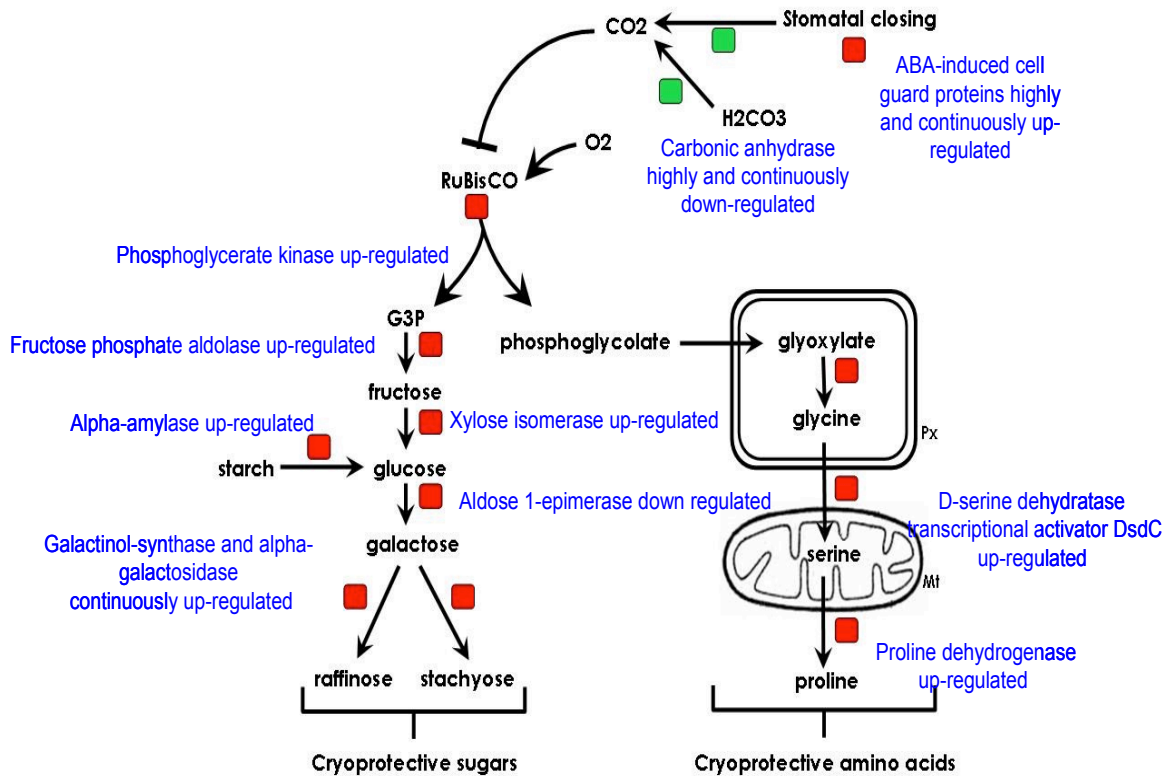


Figure 7. Scheme representing photorespiration, as key of metabolic changes in *Medicago truncatula* F 83005-5 plants under cold stress. Red squares represent an up-regulation and green squares represent down-regulation.

ABA induced cell guard proteins were strongly and continuously up-regulated in F 83005-5 plants comparing with DZA 045-5 sensitive plants, triggering the stomatal closing and consequently, the blocking of the gaseous CO<sub>2</sub> entry. The carbonic anhydrase was strongly and continuously down-regulated indicating the unavailability of the soluble CO<sub>2</sub>. RuBisCO was found continuously up-regulated, its function being possible only by the O<sub>2</sub> fixation. Photorespiration was clearly activated under cold stress, leading to production of G3P (glyceraldehyde-3-phosphate) and phosphoglycolate. Phosphoglycerate kinase and fructose phosphate aldolase were found up-regulated under cold stress suggesting that the transformation of the G3P into D-fructose-6P was strongly activated. Transformation of D-fructose into alpha-D-glucose was due to the xylose isomerase, found equally up-regulated under cold stress. Alpha-D-glucose was also produced by the starch degradation, alpha-amylase being up-regulated. Transformation of the alpha-D-glucose into its isoform  $\beta$ -D-glucose was found inhibited by the continuous strong down-regulation of the aldose 1-epimerase. Consequently, the galactose metabolism using preferentially the alpha-D-glucose was favored, leading to the raffinose and stachyose biosynthesis. Galactinol-synthase and alpha-galactosidase were found continuously up-regulated in F83 plants, in agreement with the cryoprotective sugar synthesis.

To synthesize cryoprotective amino acids, phosphoglycolate is transformed into glyoxylate in peroxisomes where the glycine biosynthesis occurs. The availability of the oxaloacetate for this reaction is due to the down-regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase which in normal conditions catalyzes the transformation of the PEP (phosphoenol-pyruvate) into oxaloacetate. In mitochondria glycine is transformed into serine and further lead to the proline synthesis. Transcriptomic evidences in this sense were the D-serine dehydratase transcriptional activator DsdC and proline dehydrogenase cold regulations.

### *Cold-response of cryoprotective sugars*

Many genes coding for enzymes involved in gluconeogenesis were differentially regulated during the acclimation time course (Figures 3E and 7). Most of them catalyze a continuous cascade of reactions beginning with 3-phosphoglycerate produced by the photorespiration. It is converted into glycerate-1,3 biphosphate and further into glyceraldehyde-3 phosphate, supported by the phosphoglycerate kinase found continuously activated during cold acclimation; the glyceraldehyde-3 phosphate is then transformed in D-fructose-1,6 biphosphate by the plastidic aldolase, also found continuously activated; the following step is the transformation of the D-fructose-1,6 biphosphate in D-fructose-6 phosphate by the fructose-1,6-bisphosphatase that was found equally continuously activated under cold stress.

Regarding the stored carbohydrates, starch is early hydrolyzed and continuously used by the alpha-amylase to produce alpha-D-glucose. R1 protein also contributes to the starch degradation (Ritte et al., 2000) but this was observed only in the late phase of acclimation (Figure 3F). Obtained by gluconeogenesis or by starch hydrolysis, glucose represents the starting point in the cryoprotective sugar synthesis. Raffinose metabolism was found more increased by cold stress in F 83005-5 tolerant plants than in DZA 045-5 sensitive plants at the expression level of galactinol synthase and alpha galactosidase encoding genes (Figures 3E and 7).

### *Cold-response of cryoprotective amino acids*

Photorespiration might induce glycine production from glyoxylate and consequently, cryoprotective amino acids as serine and proline. At transcriptional level, a phosphoenolpyruvate carboxykinase (PPCK) was found continuously repressed during cold stress in F 83005-5 plants (Figure 3E). PPCK acts to convert the oxaloacetate into phosphoenolpyruvate (PEP) and its repression suggests that oxaloacetate can remain available for glyoxylate formation and glycine synthesis.

D-serine dehydratase transcriptional activator DsdC was found down regulated in F 83005-5 plants during cold acclimation (Figure 3E). Serine dehydratase has a deaminating function catalyzing the D-serine transformation into pyruvate and  $\text{NH}_3$ . Consequently, serine might accumulate further in F 83005-5 than in DZA 045-5 (Figure 7).

Proline is catabolized to glutamate by the sequential action of two enzymes, proline oxidase (dehydrogenase) and delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (Brandriss and

Magasanik, 1979). In *Saccharomyces cerevisiae*, when PUT1-encoded proline oxidase was disrupted, cells accumulated higher levels of proline conferring higher resistance to freezing stress (Morita et al., 2002). We found the *Medicago truncatula* homologous of proline oxidase being down-regulated during cold acclimation, indicating a proline accumulation in F 83005-5 plants (Figures 3E and 7).

#### *Particular case of wound and disease resistance related genes*

In the results of functional profile grouping (figure 3), wound and pathogenesis related genes group emerged as the most abundant one (figure 3M), even before transcription factors. The largest class of resistance genes encoding for NBS-LRR (nucleotide-binding site-leu-rich repeat) proteins were reported 3 times as many in *M. truncatula* as in *A. thaliana* (Zhu et al., 2002; Ameline-Torregrosa et al., 2008). The large majority of resistance genes in *M. truncatula* localized on LG3 and especially on LG6, being in clusters most of the time (Zhu et al., 2002; Choi et al., 2004a). QTL mapping results showed that the most explanatory QTLs for freezing tolerance (FDS2W and ElecLeak) located on LG6 (figure 6). As most of genes on *M. truncatula* LG6 belongs to resistance genes analog (RGA) group (Choi et al., 2004a), transcriptomic results seemed to corroborate the importance of this LG since the largest group of genes regulated were related to pathogenesis relations. It is known now that multiple signaling pathways regulate the stress responses of plants (Knight and Knight, 2001) and patterns of expression of different stress factors related genes overlap (Seki et al., 2001; Chen et al., 2002). Certainly because in natural conditions, at a time, plants are subjected to numerous stresses collectively, biotic or abiotic. By inoculating *A. thaliana* plants with rhizobacteria, Timmusk and Wagner (1999) enhanced protection against *Erwinia carotovora* and also dehydration stress. Conversely, distinct abiotic stresses induced the expression of antifungal protein in *Castanea sativa* (Pernas et al., 2000). Furthermore, antifreeze proteins (AFPs) that have long been showed as involved in freezing tolerance (reviewed by Moffatt et al., 2006)) were found to be homologous to pathogenesis-related proteins (PR) and hence possessed both resistance to cold and pathogens (Hon et al., 1995; Zhang et al., 2007). These defense-related genes are possibly expressed during cold acclimation to prevent fungal attack during winter, when there is little metabolic activity or de novo gene expression (Joosen et al., 2006).

*Selection of putative cold-induced candidate genes in QTL intervals*

By comparing highly expressed genes at either stage in F 83005-5 tolerant line vs. DZA 045-5 sensitive) in QTL intervals of LG1, LG4 and LG6 (Tables 4, 6 & 8), a list of 10 genes can be retrieved in a first step as interesting for candidate, that have already been reported as involved in freezing tolerance (Table 10). Among them was the drought responsive element binding protein (DREB/CBF), a transcription factor that has been long described as involved in freezing tolerance in different species (Gilmour et al., 1998; Agarwal et al., 2006; Kosova et al., 2007). *CBFs* have been reported as rapidly induced (within 15 min) in response to cold, reaching its peak expression after a few hours and thereafter its expression declines becoming undetectable within less than 24h (Stockinger et al., 1997; Pennycooke et al., 2008). Even though transcripts analyzed here were obtained from samples cold acclimated for 1 day and 14 days, CBF transcripts were detected at both stages. The reason of this situation remains unclear.

Ribosomal proteins are involved in cellular process of translation by stabilizing rRNA, therefore, essential for the maintenance of translational activity. Different experiments showed that long-term cold exposure causes changes in the protein synthesizing system leading to optimized translational capacity under the altered conditions (Hahn and Walbot, 1989; Lásztity et al., 1999). Ribosomal protein genes have then been shown up-regulated in relation with freezing tolerance in different plants (Lang et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Lectins are glycoproteins that have been implicated in mechanism as seed storage proteins, toxic defense molecules, and in the recognition process between host plants and symbiotic bacteria (Etzler, 1985; Chrispeels and Raikhel, 1991). Furthermore, lectins possibly play a role of stabilization of cellular membrane against environmental stresses such as low temperature, being cryoprotective in frost hardiness (Hincha et al., 1997). Indeed, cell-wall lectins from root of winter wheat seedlings have been shown involved in adaptation to stresses like low temperatures (Garaeva et al., 2006).

A blastx search of the DFCI annotated TC101546 on NCBI web site retrieved among high scored matching results, Arabidopsis Cytokinin-O-glucosyltransferase 2 (Zeatin O-glucosyltransferase 2), Cytokinin-N-glucosyltransferase 2 (UDP-glucosyl transferase 76C2), Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase (UDP glucose:anthocyanin 5-O-glucosyltransferase) and Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UDP glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase). Glycosyltransferases (EC 2.4.x.y), are a family of enzymes which catalyze the transfer of sugar moieties from activated donor molecules to specific acceptor

molecules, forming glycosidic bonds (Campbell et al., 1998), therefore involved in carbohydrate metabolism. Zeatin O-glucosyltransferase has been reported as involved in cold tolerance by accumulating under cold stress in *Phaseolus vulgaris* and maize (Brandon et al., 1992; Li et al., 2000). Using DNA microarrays to monitor expression profiles of *A. thaliana* during cold acclimation, Oono et al. (2006) found glycosyltransferases as one of the interesting up-regulated gene group.

Heat shock proteins (HSP) are a group of proteins whose expression is increased when cells are exposed to elevated temperatures or other stresses (Schlesinger, 1990). Several studies have reported their involvement in low temperature tolerance through their accumulation following exposure to low temperatures in plants such as poplar (Renaut et al., 2005), chestnut (Lopez-Matas et al., 2004) or tomato (Li et al., 2003b).

LEA (late embryogenesis abundant) proteins are abundant at late embryogenesis stage and synthesized in the seeds of all higher plants during the later stages of development. Divided into 5 groups, LEA proteins have been reported involved in protecting plants from damage induced by abiotic stresses, particularly dehydration (Ingram and Bartels, 1996). Dehydrins, proteins that belong to LEA group 2 or LEA D11, have been shown to be regulated by the CBF and other pathways (Fowler and Thomashow, 2002). In general, many COR/LEA proteins have been shown to be involved in freezing tolerance in different species (Wang et al., 2003).

Glutathione transferases (EC 2.5.1.18) catalyze the conjugation of intracellular glutathione (GSH) to various electrophilic compounds. They catalyze nucleophilic substitution or addition reactions, but they can also act as peroxidase, isomerase, or just as binding protein sequestering hydrophobic molecules (Edwards et al., 2000). They are then part of the complex detoxification system of xenobiotics and oxygen radicals in plant and animal cells (Daniel, 1993). It is well established that glutathione, a component in the ascorbate-glutathione cycle, plays an important role in cold acclimation (Kocsy et al., 2001). Glutathione transferases have been involved in cold tolerance in different species (Kocsy et al., 2000; Yu et al., 2002; Janda et al., 2003).

F-Box proteins include protein-protein interaction domains that confer substrate specificity for ubiquitination. Ubiquitin-dependent proteolysis has been reported to selectively degrade certain proteins (Callis and Vierstra, 2000). Also associated with cellular functions such as signal transduction and regulation of the cell cycle (Craig and Tyers, 1999), F-box proteins in plants are represented in gene networks regulated by microRNA-mediated gene silencing (Jones-Rhoades et al., 2006). In trifoliolate orange, cold

acclimation induced genes included an F-box protein (Zhang et al., 2005) and in rice, two putative F-box protein genes have been reported as among putative candidate genes underlying a cold tolerance QTL (Saito et al., 2004).

Endochitinases are ubiquitous proteins in plants. Chitinases are one of antifreeze proteins type which bind to the surface of ice crystals and prevent crystal growth (Hon et al., 1994), besides their role in the plant defense against pathogens. Accumulating in cell wall upon cold acclimation, chitinases have been reported as involved in freezing tolerance in plants such as winter rye (Pihakaski-Maunsbach et al., 2001).

High mobility group proteins (HMG) are a family of non-histone components in chromatin. They play important architectural roles in the assembly of nucleoprotein complexes in a variety of biological processes as recombination, initiation of transcription, and DNA repair (Thomas, 2001). They were found up-regulated by cold in *A. thaliana* (Kwak et al., 2007) and in wheat (Christov et al., 2007).

Table 10. Retained putative candidate genes for freezing tolerance in *M. truncatula*.

DFCI MtG8 GenBank ID	Plant gene	Similarity	Function	LG
TC106617	PIR T06431 T06431 ribosomal protein L27-5	100%	Protein biosynthesis	4
TC97907	UPI LEC1_MEDTR (Q01806) Lectin 1 precursor	100%	Lectin that may be involved in a cell recognition process	4
TC101546	UPI Q6VAB3 (Q6VAB3) UDP-glycosyltransferase 85A8	66%	Transferase activity, transferring glycosyl groups	1; 4
TC95357	UPI Q39889 (Q39889) Heat shock protein	53%	ATP binding; nucleoside-triphosphatase activity; protein binding; protein metabolic process; response to stress	4
TC94509	UPI Q9FNW7 (Q9FNW7) Seed maturation protein LEA 4	50%	Embryonic development	6
TC97943	UPI Q5RM57 (Q5RM57) Drought responsive element binding protein	50%	Transcription factor activity	1
TC94261	UPI O49821 (O49821) Glutathione transferase	49%	Detoxification enzyme: catalyzes the conjugation of glutathione to various electrophilic compounds; can also act as peroxidase, isomerase, or just as binding protein sequestering hydrophobic molecules	1; 4; 6
TC100350	UPI Q6L3S8 (Q6L3S8) Putative F-Box protein	12%	Protein kinase activity; ATP binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity	4
TC109831	UPI CHIT_PETHY (P29021) Acidic endochitinase precursor	7%	Defense against chitin containing fungal pathogens	6
TC103227	UPI HMG2_RAT (P52925) High mobility group protein 2 (HMG-2)	6%	Binds to DNA in gene transcription, has transcription factor activity	4

In our analyses, 12 highly expressed ( $\geq 10$  fold) genes have been found. However, only one of them located in either QTL interval in *M. truncatula* linkage groups. Different hypotheses can be made: (a) may be some of these genes that were not found in QTL intervals were involved in different processes other than the freezing tolerance process itself and might have been induced by another factor, not the low temperature; (b) may be our genetic linkage map, with its present markers didn't allow us to map other QTLs to intervals of those genes; this hypothesis is supported by the fact that the highly induced *CAR* gene



was localized on LG7 were no freezing damage QTL was detected; (c) may be, despite their localization on other LG, these genes were yet involved in the freezing tolerance, acting together with those under QTL positions; in fact, evidences are being brought to support inter-chromosomal communication, a complex phenomenon (Spilianakis et al., 2005; Fraser, 2006), just like freezing tolerance.

Our QTL mapping showed that the 7 cM interval on LG6 contained the most important QTL of freezing damage ( $R^2 \sim 40\%$ ). Among the 10 genes retained as interestingly regulated during cold acclimation and underlying the detected QTLs, 3 were mapped in the 7 cM interval on LG6. Among This result put the emphasis on these genes which are related to LEA 4, glutathione transferase and endochitinase precursor. It would be interesting to focus on these three in a first time while trying to validate their effect in the freezing tolerance of *M. truncatula*.

## CONCLUSION

The samples used for transcriptomic analysis in this study were collected after 1 day and 14 days under acclimation conditions. Certainly, this was not suitable for detecting very early or transient responses. Surprisingly, transcripts of *CBF* gene were detected up-regulated while *CBF* genes have often been reported as induced very early upon low temperature exposure, declining after a few hours progressively to undetectable levels. The reason of the different pattern obtained in our experiment for the *CBF* gene remains unclear. Interpreting the transcriptome changes requires caution because changes in mRNA levels may not correlate with changes in protein or enzyme activity levels. The use of limited experimental points and without those of very early acclimation points may lead to miss some genes yet involved in the cold signaling process. Another reason for caution is that most of the highly ( $\geq 10$  fold) induced genes in our experiment failed to locate in QTL intervals. Nevertheless, we successfully showed differences between the two parents of our RIL population, related to their freezing tolerance contrast. These results provide starting points towards more in depth analyses. The ten genes detected here are to be validated and for further analyses, genome positions corresponding to the tentative sequences involved can be searched for polymorphisms to use for mapping the genes on the LR3 genetic map. This way, more precision would be brought to the genes as putative candidates underlying freezing tolerance QTLs in *M. truncatula*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Jean-Marie Prosperi and Magalie Delalande from INRA center of Mauguio (Montpellier, France) for kindly providing seeds of the *M. truncatula* LR3 population. We are also grateful to F. Depta, J-F Hû, B. Decaux, Denis Florillo, R. Devaux, H. Sellier, K. Lourgant, V. Fontaine, A. Ketele from INRA-Mons, for either their technical support or help for samplings; Isabelle Le Goff from INRA-Rennes for her marker-genotyping support.

This work was supported by the Regional Council of Picardie and UNIP (Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en Proteines) for the PhD project of K. Avia.

**LITERATURE CITED**

- Agarwal PK, Parinita A, Reddy MK, Sopory SK** (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* **25**: 1263-1274
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Ameline-Torregrosa C, Wang B-B, O'Bleness MS, Deshpande S, Zhu H, Roe B, Young ND, Cannon SB** (2008) Identification and Characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in the Model Plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **146**: 5-21
- Avia K, Pilet M-L, Bahrman N, Baranger A, Fontaine V, Hamon C, Hanocq E, Niarquin M, Sellier H, Vuylsteker C, Prosperi J-M, Lejeune-Hénaut I** (2008) Freezing tolerance in *Medicago truncatula* accessions and QTLs for freezing damage colocalizing with related physiological traits (Submitted). *Plant Physiol*
- Badger MR, Price GD** (1992) The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol Plant* **84**: 606-615
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* **57**: 289-300
- Berry JO, Breiding DE, Klessig DF** (1990) Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *The Plant Cell* **2**: 795
- Bertrand A, Prevost D, Bigras FJ, Castonguay Y** (2007) Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> and Strain of *Rhizobium* Alter Freezing Tolerance and Cold-induced Molecular Changes in Alfalfa (*Medicago sativa*). *Ann Bot* **99**: 275
- Boyer JS** (1982) Plant Productivity and Environment. *Science* **218**: 443-448
- Brandon DL, Corse J, Higaki PC, Zavala ME** (1992) Monoclonal antibodies for analysis of cytokinin O-glucosides in response to cold stress. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. Edited by Kamínek, M., Zazimalová, E. and Mok, DWS: 447-453
- Brandriss MC, Magasanik B** (1979) Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *J Bacteriol* **140**: 498
- Callis J, Vierstra RD** (2000) Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 381-386
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V** (1998) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **329**: 719
- Cao S, Ye M, Jiang S** (2005) Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **24**: 683-690
- Cao SQ, Song YQ, Su L** (2007) Freezing sensitivity in the gigantea mutant of *Arabidopsis* is associated with sugar deficiency. *Biologia Plantarum* **51**: 359-362
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* **30**: 239-264
- Chen WQ, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T,**

- Dangl JL, Wang X, Zhu T** (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**: 559-574
- Choi HK, Kim DJ, Uhm TS, Limpens E, Lim HJ, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR** (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**: 1463-1502
- Chrispeels MJ, Raikhel NV** (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell* **3**: 1
- Christov N, Yoneyama S, Shimamoto Y, Imai R** (2007) Differential expression of wheat genes during cold acclimation. *Cytology and Genetics* **41**: 142-150
- Craig KL, Tyers M** (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **72**: 299-328
- Daniel V** (1993) Glutathione S-Transferases: Gene Structure and Regulation of Expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 173-207
- de Lorenzo L, Merchan F, Blanchet S, Megias M, Frugier F, Crespi M, Sousa C** (2007) Differential expression of the TFIIIA regulatory pathway in response to salt stress between *Medicago truncatula* genotypes(1[W]). *Plant Physiol* **145**: 1521-1532
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* **5**: 193-198
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863
- Etzler ME** (1985) Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. *Annual Reviews in Plant Physiology* **36**: 209-234
- Fowler DB, Limin AE, Wang S, Ward RW** (1996) Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Can J Plant Sci* **76**: 37-42
- Fowler S, Thomashow MF** (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**: 1675-1690
- Fraser P** (2006) Transcriptional control thrown for a loop. *Curr Opin Genet Dev* **16**: 490-495
- Garaeva LD, Pozdeeva SA, Timofeeva OA, Khokhlova LP** (2006) Cell-wall lectins during winter wheat cold hardening. *Russ J Plant Physiol* **53**: 746-750
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF** (2000) Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* **124**: 1854-1865
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF** (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* **16**: 433
- Gollan T, Passioura JB, Munns R** (1986) Soil water status affects stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Aust J Plant Physiol* **13**: 459-464
- Haagenson DM, Cunningham SM, Joern BC, Volenec JJ** (2003) Autumn defoliation effects on alfalfa winter survival, root physiology, and gene expression. *Crop Sci* **43**: 1340-1348

- Hahn M, Walbot V** (1989) Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiol* **91**: 930-938
- Hincha DK, Pfüller U, Schmitt JM** (1997) The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album* L.) leaves is correlated with leaf frost hardiness. *Planta* **203**: 140-144
- Hon W, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DSC** (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* **109**: 879-889
- Hon WC, Griffith M, Chong P, Yang DSC** (1994) Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol* **104**: 971-980
- Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 377
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF** (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104
- Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, Veisz O, Páldi E** (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci* **164**: 301-306
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* **57**: 19-53
- Joosen RVL, Lammers M, Balk PA, Bronnum P, Konings MCJM, Perks M, Stattin E, Wordragen MFv, Geest AHMvd** (2006) Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiol* **26**: 1297-1313
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO** (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *The Plant Journal* **25**: 247-259
- Knight H, Knight MR** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262-267
- Kochert G** (1992) Rice as a model system. *In* Grass evolution and domestication., pp 290-315
- Kocsy G, Galiba G, Brunold C** (2001) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol Plant* **113**: 158-164
- Kocsy G, Szalai G, Vágújfalvi A, Stéhli L, Orosz G, Galiba G** (2000) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* **210**: 295-301
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT** (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum* **51**: 601-617
- Kwak KJ, Kim JY, Kim YO, Kang H** (2007) Characterization of Transgenic *Arabidopsis* Plants Overexpressing High Mobility Group B Proteins under High Salinity, Drought or Cold Stress. *Plant Cell Physiol* **48**: 221-231
- Lang P, Zhang C-k, Ebel RC, Dane F, Dozier WA** (2005) Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene* **359**: 111-118
- Lásztity D, Rácz I, Páldi E** (1999) Effect of long periods of low temperature exposure on protein synthesis activity in wheat seedlings. *Plant Sci* **149**: 59-62
- Lee BH, Henderson DA, Zhu JK** (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* **17**: 3155-3175

- Levitt J** (1980) Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press., New York, USA
- Li H, Chang C, Lu L, Liu C, Chan M, Charng Y** (2003) Over-expression of Arabidopsis thaliana heat shock factor gene (AtHsf1b) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. Botanical Bulletin of Academia Sinica **44**: 129-140
- Li R, Sosa JL, Zavala ME** (2000) Accumulation of zeatin O-glycosyltransferase in Phaseolus vulgaris and Zea mays following cold stress. Plant Growth Regulation **32**: 295-305
- Lopez-Matas MA, Nunez P, Soto A, Allona I, Casado R, Collada C, Guevara MA, Aragoncillo C, Gomez L** (2004) Protein Cryoprotective Activity of a Cytosolic Small Heat Shock Protein That Accumulates Constitutively in Chestnut Stems and Is Up-Regulated by Low and High Temperatures. Plant Physiol **134**: 1708-1717
- MacRobbie EAC** (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **353**: 1475-1488
- Marisa L, Ichante JL, Reymond N, Aggerbeck L, Delacroix H, Mucchielli-Giorgi MH** (2007) MAnGO: an interactive R-based tool for two-colour microarray analysis. Bioinformatics **23**: 2339
- Mäser P, Leonhardt N, Schroeder JI** (2003) The Clickable Guard Cell: Electronically Linked Model of Guard Cell Signal Transduction Pathways. The Arabidopsis Book: 1-4
- Matiru VN, Dakora FD** (2005) Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. New Phytol **165**: 847-855
- Merchan F, Lorenzo Ld, Rizzo SG, Niebel A, Manyani H, Frugier F, Sousa C, Crespi M** (2007) Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in Medicago truncatula. Plant J **51**: 1-17
- Mitra M, Lato SM, Ynalvez RA, Xiao Y, Moroney JV** (2004) Identification of a New Chloroplast Carbonic Anhydrase in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiol **135**: 173-182
- Moffatt B, Ewart V, Eastman A** (2006) Cold comfort: plant antifreeze proteins. Physiol Plant **126**: 5-16
- Monroy A, Dryanova A, Malette B, Oren D, Ridha Farajalla M, Liu W, Danyluk J, Ubayasena L, Kane K, Scoles G, Sarhan F, Gulick P** (2007) Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. Plant Mol Biol **64**: 409-423
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H** (2002) Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of Saccharomyces cerevisiae. J Biosci Bioeng **94**: 390-394
- Mun J-H, Kim D-J, Choi H-K, Gish J, DeBelle F, Mudge J, Denny R, Endre G, Saurat O, Duzde AM, Kis GB, Roe B, Young ND, Cook DR** (2006) Distribution of microsatellites in the genome of Medicago truncatula: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. Genetics **172**: 2541-2555
- Norman EG, Walton AB, Turpin DH** (1994) Immediate activation of respiration in Petroselinum crispum L. in response to the Phytophthora megasperma f. sp. glycinea elicitor. Plant Physiol **106**: 1541-1546

- Okubara PA, Pawlowski K, Murphy TM, Berry AM** (1999) Symbiotic root nodules of the actinorhizal plant *Datisca glomerata* express Rubisco activase mRNA. *Plant Physiol* **120**: 411-420
- Oono Y, Seki M, Satou M, Iida K, Akiyama K, Sakurai T, Fujita M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Monitoring expression profiles of Arabidopsis genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* **6**: 212-234
- Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS** (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J* **23**: 785-794
- Pang PP, Meyerowitz EM** (1987) *Arabidopsis thaliana*: a model system for plant molecular biology. *Bio/Technology* **5**: 1177-1181
- Pennycooke JC, Cheng H, Stockinger EJ** (2008) Comparative Genomic Sequence and Expression Analyses of *Medicago truncatula* and Alfalfa Subspecies *falcata* COLD-ACCLIMATION-SPECIFIC Genes. *Plant Physiol* **146**: 1242-1254
- Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G** (2000) Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Lett* **467**: 206-210
- Pihakaski-Maunsbach K, Moffatt B, Testillano P, Risueno M, Yeh S, Griffith M, Maunsbach AB** (2001) Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter rye shoots. *Physiol Plant* **112**: 359-371
- Prasil IT, Prasilova P, Pankova K** (2004) Relationships among vernalization, shoot apex development and frost tolerance in wheat. *Ann Bot* **94**: 413-418
- Reed ML, Graham D** (1981) Carbonic anhydrase in plants: distribution, properties and possible physiological roles. In L Reinhold, JB Harborn, T Swain, eds, *Progress in Phytochemistry* 7. Pergamon Press, Oxford pp 47-94
- Renaut J, Hoffmann L, Hausman JF** (2005) Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiol Plant* **125**: 82-94
- Ritte G, Lorberth R, Steup M** (2000) Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant J* **21**: 387-391
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkott M** (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: 5539
- Saito K, Hayano-Saito Y, Maruyama-Funatsuki W, Sato Y, Kato A** (2004) Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus Ctb1 for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor Appl Genet* **109**: 515-522
- Salamov AA, Solovyev VV** (2000) Ab initio Gene Finding in *Drosophila* Genomic DNA. *Genome Res* **10**: 516
- Schlesinger MJ** (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem* **265**: 12111-12114
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 217-223

- Smyth GK** (2005) Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York
- Smyth GK, Speed T** (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**: 265-273
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA** (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* **435**: 637-645
- Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14570
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1035
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H** (2003) Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J* **36**: 830-841
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 417-426
- Thomas JO** (2001) HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans* **29**: 395-401
- Thomashow MF** (1990) Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv Genet* **28**: 99
- Thomashow MF** (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 571-599
- Thomashow MF, Artus NN, Bloksberg A, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Wilhelm K, Uemura M, Webb M, Steponkus PL** (1996) Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*: function and regulation of COR genes. In *Physical stresses in plants: genes and their products for tolerance*. Proceedings of a workshop held at Maratea, Italy, 24-27 September 1995. Springer-Verlag, Berlin Germany, pp 71-81
- Timmusk S, Wagner EGH** (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 951-959
- Tobin EM, Silverthorne J** (1985) Light Regulation of Gene Expression in Higher Plants. *Annual Reviews in Plant Physiology* **36**: 569-593
- Tolbert NE** (1981) Metabolic Pathways in Peroxisomes and Glyoxysomes. *Annual Reviews in Biochemistry* **50**: 133-157
- Viswanathan C, Zhu JH, Zhu JK** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci* **12**: 444-451
- Viswanathan C, Zhu JK** (2002) Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **357**: 877-886
- Vogel JT, Zarka DG, Buskirk HAv, Fowler SG, Thomashow MF** (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J* **41**: 195-211
- Voorrips RE** (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* **93**: 77-78



- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB** (2007) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Weiser CJ** (1970) Cold Resistance and Injury in Woody Plants: Knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage. *Science* **169**: 1269-1278
- Yan X, Khan S, Hase T, Emes MJ, Bowsher CG** (2006) Differential uptake of photosynthetic and non-photosynthetic proteins by pea root plastids. *FEBS Lett* **580**: 6509-6512
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP** (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S** (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **137**: 1174-1181
- Yu C, Murphy TM, Sung W, Lin C** (2002) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. *Funct Plant Biol* **29**: 1081-1087
- Zhang C-k, Lang P, Dane F, Ebel RC, Singh NK, Locy RD, Dozier WA** (2005a) Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Rep* **23**: 764-769
- Zhang CK, Lang P, Dane F, Ebel RC, Singh NK, Locy RD, Dozier WA** (2005b) Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Rep* **23**: 764-769
- Zhang S, Wei Y, Pan H** (2007) Transgenic Rice Plants Expressing a Novel Antifreeze Glycopeptide Possess Resistance to Cold and Disease. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C* **62**: 583
- Zhu HY, Cannon SB, Young ND, Cook DR** (2002) Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 529-539

## **Partie V.**

### **Conclusion et perspectives**

<b>PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>152</b>
I. MISE AU POINT DES OUTILS DE PHENOTYPAGE DE LA TOLERANCE AU GEL CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....	152
A. Optimisation des tests de tolérance au gel en chambre climatisée .....	152
B. Mise en oeuvre du test de tolérance LT <sub>50</sub> réalisé en serre et chambre climatisée .....	153
II. VARIABILITE DE LA TOLERANCE AU GEL .....	154
III. CARTOGRAPHIE DE QTL.....	155
IV. VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES AU COURS DE L'ACCLIMATATION AU FROID .....	156
V. RECHERCHE DE GENES CANDIDATS LIES AUX QTL DE TOLERANCE AU GEL DETECTES.....	157
VI. VALIDATION DES GENES CANDIDATS .....	158
VII. TRANSFERT DE RESULTATS VERS LE POIS .....	159

---

## Partie V. Conclusion et perspectives

---

Les objectifs de ma thèse étaient de mettre au point des outils de phénotypage de la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*, de cartographier des QTL de la tolérance au gel ou d'autres paramètres relatifs à la capacité d'acclimatation au froid et enfin de rechercher des gènes candidats sous-jacents à ces QTL. Ces trois principaux objectifs ont été atteints, en collaboration avec les équipes de l'INRA de Montpellier pour les ressources végétales, de l'INRA de Rennes pour la carte génétique et du CNRS de Gif sur Yvette pour la transcriptomique.

### I. Mise au point des outils de phénotypage de la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse ont permis à la fois d'optimiser les conditions expérimentales du test de tolérance au gel en chambre climatisée et de valider dans ces conditions des variables discriminantes pour le phénotypage du matériel végétal. J'ai également adapté de la bibliographie le protocole d'un test se déroulant successivement en serre et en chambre climatisée et mettant en œuvre un calcul de la température de tolérance au gel (test LT<sub>50</sub>).

#### A. Optimisation des tests de tolérance au gel en chambre climatisée

La première étape a été la mise au point, pour *Medicago truncatula*, du test de la tolérance au gel incluant une période préalable d'acclimatation, à partir des protocoles déjà utilisés en routine dans l'unité pour le pois (Bourion et al., 2003). Les principales modifications apportées aux conditions expérimentales concernent la durée et le déroulement de la phase d'acclimatation au froid, qui est plus longue et plus progressive dans le cas de *Medicago truncatula*, pour permettre une meilleure expression de la variabilité génétique (<http://www.noble.org/MedicagoHandbook/> ; Avia et al., 2008). Ce test a permis de discriminer efficacement le matériel végétal étudié constitué d'une part par une collection de

15 lignées représentatives de la variabilité de l'espèce et d'autre part par une population de 178 lignées recombinantes (population LR3) issues du croisement F 83005-5 x DZA 045-5.

En me basant sur l'expérience acquise au sein de l'équipe pour *Pisum sativum*, j'ai également mis en place un test comparatif du précédent, sans acclimatation préalable au froid avant la période de gel. Ce test sans acclimatation reproduit les mêmes cinétiques de température et de photopériode que le précédent, excepté pour la phase d'acclimatation qui est remplacée par une période où l'on maintient le régime de températures douces appliqué pendant la phase de germination et de développement initial des plantules. La durée de cette période de remplacement de la phase d'acclimatation a été estimée pour que les plantules qui entrent en phase de gel soient au même stade dans les deux tests "avec" et "sans acclimatation". La mise en œuvre conjointe de ces deux tests est particulièrement importante pour l'interprétation des variables mesurées au cours de l'acclimatation pour expliquer la variabilité de la tolérance au gel : la comparaison des résultats obtenus au cours des deux cinétiques permet en effet de dissocier les effets de l'acclimatation au froid de ceux qui sont liés au vieillissement de la plante.

Les variables que j'ai utilisées pour évaluer la tolérance au gel sont des variables descriptives des dégâts de gel observés à l'échelle de la plante entière (note des dégâts visibles sur l'appareil aérien, sur une échelle de 0 à 5) ou au niveau tissulaire (fuite d'électrolytes, mesurée sur les organes foliaires au cours de l'acclimatation au froid). Pour compléter ces évaluations, je pense qu'il serait intéressant de mesurer le ratio de la fluorescence chlorophyllienne ( $F_V/F_M$ ) considéré comme un bon indicateur quantitatif du rendement potentiel quantique du PSII et utilisé chez de nombreuses espèces pour quantifier les dommages liés aux stress. Cette mesure permettrait en outre d'évaluer les éventuels effets de la photoinhibition au cours de la phase d'acclimatation car, dans la chambre climatisée que j'ai utilisée, l'énergie lumineuse dispensée est relativement élevée ( $500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) et pourrait accentuer ce phénomène. En fonction des résultats, une réduction de l'intensité lumineuse est envisageable dans le but d'obtenir une meilleure expression de la variabilité génétique de la tolérance au gel.

## **B. Mise en oeuvre du test de tolérance $LT_{50}$ réalisé en serre et chambre climatisée**

Pour pouvoir comparer la variabilité de la tolérance au gel du matériel étudié sur la base d'une variable souvent rencontrée dans la bibliographie, j'ai mis en place un test de type  $LT_{50}$ . Ce test présente deux principales différences par rapport au test avec acclimatation présenté précédemment :

- au niveau du déroulement : les graines sont semées en serre où les plantules se développent jusqu'au stade d'environ une dizaine de feuilles avant d'être transférées en chambre climatisée pour l'acclimatation au froid ;

- au niveau de la variable d'évaluation de la tolérance au gel : lors d'une phase nocturne de gel au cours de laquelle la température est abaissée progressivement de 0 à  $-10^{\circ}\text{C}$ , les plantes subissent une nucléation artificielle préalable et les fuites d'électrolytes sont mesurées sur des plantes dégelées après avoir atteint les températures de 0,  $-2^{\circ}\text{C}$ ,  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $-6^{\circ}\text{C}$ ,  $-8^{\circ}\text{C}$  et  $-10^{\circ}\text{C}$  ; on peut alors calculer pour chaque génotype la température  $LT_{50}$  qui correspond à la température à laquelle les fuites d'électrolytes atteignent 50% des fuites maximales observées.

## II. Variabilité de la tolérance au gel

Le test de tolérance avec acclimatation et le test  $LT_{50}$  ont donné des résultats concordants pour la collection de 15 accessions. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une variabilité relativement étendue de la tolérance au gel sur une gamme de génotypes représentative de la variabilité de l'espèce. La  $LT_{50}$  des génotypes les plus résistants de la collection (de l'ordre de  $-7^{\circ}\text{C}$ ) concorde avec les chiffres avancés dans la bibliographie pour le cultivar Paraggio ( $-7,8^{\circ}\text{C}$ , Hekneby et al., 2006). Le test de tolérance avec acclimatation et le test  $LT_{50}$  ont également permis de valider le contraste entre les deux parents de la population de lignées recombinantes LR3, ce qui a confirmé les observations de Jean-Marie Prospéri au champ et conforté le choix de la population LR3 pour la détection de QTL. De plus, la comparaison des niveaux de tolérance obtenus pour les deux parents F 83005-5 et DZA 045-5 au cours des tests "avec" et "sans acclimatation" a montré l'effet positif de l'acclimatation au froid sur le niveau de tolérance au gel de *Medicago truncatula*, ce qui incite à décortiquer plus finement les différences génotypiques pouvant intervenir au cours de cette phase.

### III. Cartographie de QTL

Grâce aux dégâts observés à l'issue du test avec acclimatation, nous avons pu détecter des QTL de tolérance au gel au sein de la population LR3. Comparativement à l'évaluation des dégâts réalisée au cours de la période de gel, c'est l'évaluation effectuée deux semaines après le réchauffement des plantes qui donne les résultats les plus discriminants. Grâce à cette évaluation, trois principaux QTL ont été détectés sur les groupes de liaison 1, 4 et 6 avec des coefficients de détermination de 9, 9 et 40% respectivement. Le QTL du groupe de liaison 6 apparaît donc comme une cible prioritaire pour expliquer le déterminisme de la tolérance au gel.

A la suite de cette première cartographie, il serait intéressant de continuer l'inventaire des QTL dans des fonds génétiques différents pour étudier leur stabilité. Il faudrait pour cela créer de nouvelles populations dédiées aux études de la réponse au gel, dont les parents pourraient être choisis en se basant sur les résultats obtenus sur les 15 accessions. Ainsi un croisement entre une des accessions les plus tolérantes (e.g. F 20026 ou F 11005-E) et une des accessions les plus sensibles (e.g. DZA 045-5 qui est déjà un parent commun à trois populations existantes et cartographiées) serait un choix judicieux pour valider les QTL déjà cartographiés et éventuellement détecter des régions chromosomiques complémentaires pour la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*.

Pour se rapprocher des conditions de champ qui sont en général un environnement de référence pour les tests de tolérance au gel sur les espèces agronomiques comme le pois, une suggestion serait de confirmer les QTL détectés sur LR3 en conditions contrôlées dans des conditions naturelles (en champ ou sous tunnel). Cet aspect avait été abordé pendant ma thèse en réalisant une expérimentation sous tunnel pendant la période d'octobre-décembre 2006. Malheureusement il n'y a pas eu, cette année là, d'épisode de gel suffisamment sévère pour révéler des différences dans la population LR3. Néanmoins, cette validation permettrait de juger de l'extrapolabilité des QTL détectés en conditions contrôlées, et apporter des éléments à la cartographie comparative avec des légumineuses cultivées comme le pois.

#### IV. Variations physiologiques au cours de l'acclimatation au froid

On a observé que lorsque la température baisse, que ce soit au cours de la phase de pré-acclimatation ou au cours de la phase d'acclimatation, DZA 045-5 avait en général un meilleur niveau d'activités initiale et totale de Rubisco que F 83005-5, alors que ce dernier possède un niveau d'activation de l'enzyme légèrement supérieur à celui de DZA 045-5. F 83005-5 possède également une plus forte teneur en chlorophylle dans les conditions d'acclimatation au froid. La raison pour laquelle le génotype sensible possède une meilleure activité de l'enzyme principale de la photosynthèse lorsque la température diminue reste encore inconnue, mais une meilleure caractérisation du potentiel photosynthétique notamment par le paramètre  $F_V/F_M$  permettrait de mieux comprendre les réactions de l'appareil photosynthétique des deux génotypes face aux basses températures.

On a également observé chez les parents de la population d'étude qu'à 12/12°C, les sucres s'accumulaient plus fortement dans les organes qu'à 8/2°C. Il serait donc intéressant de réaliser une étude comparative de nouvelles gammes de températures d'acclimatation, avec des durées variables, afin de déterminer l'étendue de l'influence de la température d'acclimatation sur les réponses obtenues. Pour réaliser ce point, il serait important, en collaboration avec des écophysiologistes, d'élargir la gamme de validité du modèle de développement de D. Moreau (2006) vers les basses températures. Cela permettrait notamment de caler, en termes de stades de développement, des expérimentations comparatives avec *vs* sans acclimatation pour des génotypes ayant éventuellement des précocités différentes comme c'était le cas pour F 83005-5 et DZA 045-5. Dans le cadre d'études de génomique, cela permettrait aussi de piloter la prise d'échantillons pour l'étude d'ARN messagers de façon à pouvoir comparer l'expression des gènes à stade de développement équivalent, et tester plus précisément l'effet de l'acclimatation.

L'analyse des trois sucres (fructose, glucose et saccharose) chez les deux parents a par ailleurs montré que le fructose et le saccharose répondaient le plus au stress froid. Dans le cadre de la cartographie de QTL de paramètres relatifs à la capacité d'acclimatation au froid, il serait intéressant dans une deuxième étape de cartographier des QTL de concentration de fructose et saccharose ainsi que du raffinose bien décrit dans la littérature comme étant très impliqué dans l'acclimatation au froid.



## V. Recherche de gènes candidats liés aux QTL de tolérance au gel détectés

La stratégie utilisée dans cette recherche de gènes candidats était de confronter les données de QTL de tolérance au gel et à celles de transcriptomique pour identifier des groupes de liaisons où ces différentes données se chevauchent (Figure V-1). De façon générale, la recherche de gènes candidats relatifs à des QTL détectés dépend de deux facteurs principaux : la résolution de la carte génétique utilisée et la disponibilité des ressources moléculaires chez l'espèce étudiée. C'est pourquoi ce travail donne plus de résultats chez les espèces modèles disposant de ressources moléculaires conséquentes en même temps que d'un génome séquencé. *Medicago truncatula* étant une espèce modèle, nous avons pu bénéficier des nombreuses ressources moléculaires déjà disponibles, mais les résultats des analyses effectuées sont dépendants du stade de séquençage qui n'est pas complètement achevé. En effet, les contigs des BAC affiliés à chaque chromosome détaillent l'étape de séquençage de chacun des BAC. On a pu observer que la majorité de ces BAC était au stade 3, l'étape finale ; cependant certains sont encore aux stades 1 et 2 et sont éventuellement susceptibles de changer de position après les affinages réalisés au dernier stade. La conséquence est que si des gènes étaient localisés dans ces BAC sous un groupe de liaison donné, tout changement de position physique affecterait les résultats de sélection de ces gènes par rapport aux intervalles de QTL.

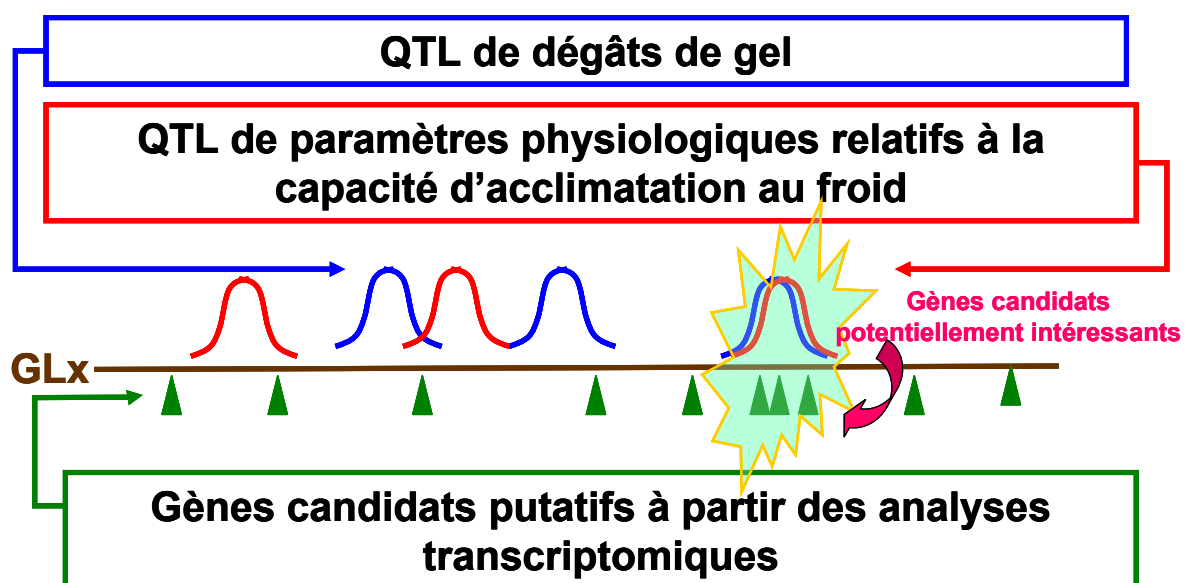


Figure V-1 : Stratégie d'identification de gènes candidats putatifs impliqués dans l'acclimatation au froid chez *Medicago truncatula*

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons bénéficié d'une carte génétique construite antérieurement. Cependant nous avons pu constater que la résolution de la carte était insuffisante dans certaines zones qui justement comportaient des QTL. En l'occurrence sur les groupes de liaison 1 et 4, il faudrait rajouter quelques marqueurs ponts avec la carte physique dans les intervalles des QTL afin de réduire ces intervalles le plus possible pour limiter le nombre de gènes potentiellement candidats à analyser. C'est ce que j'ai fait pour le groupe de liaison 6, ce qui a permis de réduire l'intervalle de recherche à 7 cM.

Par ailleurs, les données recueillies au cours de la recherche de gènes candidats chez *Medicago truncatula* pourraient être confrontées à celles existant chez d'autres espèces pour détecter des batteries de gènes qui sont systématiquement régulés quel que soit le stress abiotique, ce qui permettrait éventuellement de repérer les gènes très spécifiques à la réponse au froid.

## VI. Validation des gènes candidats

L'analyse bioinformatique des zones correspondant aux intervalles de confiance des principaux QTL détectés a permis de constituer une liste de 73, 80 et 16 gènes candidats pour les QTL de tolérance au gel des groupes de liaison 1, 4 et 6 respectivement.

Une étape de validation par qRT-PCR (Real-Time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) serait nécessaire pour confirmer l'implication de ces gènes. Par ailleurs les extractions d'ARNm ayant été faites à partir des racines, il serait intéressant (en fonction des ressources disponibles) d'analyser aussi l'expression des gènes différentiellement exprimés au cours de l'acclimatation au froid dans les feuilles. Cela permettrait notamment de confirmer la mise en évidence de la Rubisco et des gènes impliqués dans le processus de photorespiration observés dans les échantillons racinaires.

De plus, on pourrait rechercher du polymorphisme entre F 83005-5 et DZA 045-5 pour les candidats mis en évidence afin de les cartographier sur la LR3. L'ajout de marqueurs dans les intervalles de confiance des QTL permettrait d'affiner la détection et serait un élément préparatoire à une stratégie de cartographie fine. On peut cibler par exemple l'intervalle QTL du groupe de liaison 6 où se trouve le QTL de tolérance au gel le plus fort, et construire deux

lignées quasi-isogéniques se différenciant par cet intervalle. Une population descendant du croisement entre ces lignées quasi-isogéniques permettra de localiser plus finement (on peut espérer tomber dans un seul BAC) les gènes impliqués dans la tolérance au gel.

## VII. Transfert de résultats vers le pois

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse permettent de commencer une cartographie comparative de QTL et de gènes candidats entre *Medicago truncatula* et *Pisum sativum*. Les gènes candidats listés sur LR3 peuvent permettre d'ancrer plus précisément les zones correspondant aux QTL "*Medicago*" chez le pois. Il faudrait tout d'abord rechercher chez le pois les gènes orthologues aux gènes candidats listés sur LR3. Une recherche d'amorces spécifiques du pois pourrait être effectuée pour détecter du polymorphisme dans la population de lignées recombinantes Champagne x Térèse sur laquelle des QTL de tolérance au gel ont déjà été cartographiés (Lejeune-Hénaut et al., 2008). Les gènes polymorphes pourraient ainsi être cartographiés et leur position comparée à celle des QTL de tolérance au gel déjà détectés chez le pois. Ceux des gènes qui seraient liés à ces QTL pourraient alors être clonés et séquencés. Puis, on pourrait les valider en identifiant dans la collection de l'INRA de Dijon, les mutants de TILLING correspondants et en les phénotypant pour la tolérance au gel, étant donné que la transformation n'est pas encore complètement au point chez le pois. On peut aussi valider les gènes par surexpression ou répression en utilisant une technique de génie génétique comme l'ARN interférence via le bombardement de particules (Schweizer et al., 2000; Klahre et al., 2002).

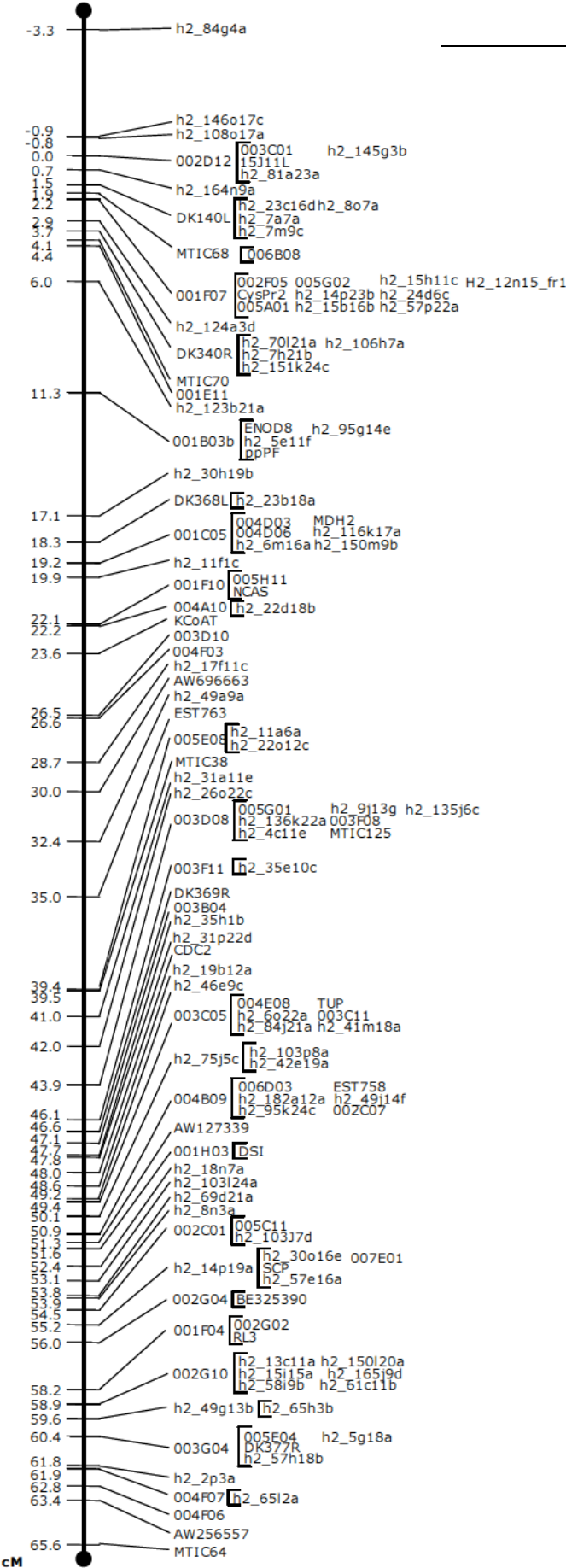
Ce travail de thèse constitue une étape importante dans la connaissance du déterminisme génétique de la tolérance au gel chez les légumineuses, mais il doit être complété pour aboutir à la validation de gènes candidats chez le pois et à la création de nouvelles variétés plus résistantes au gel.

# **ANNEXES**

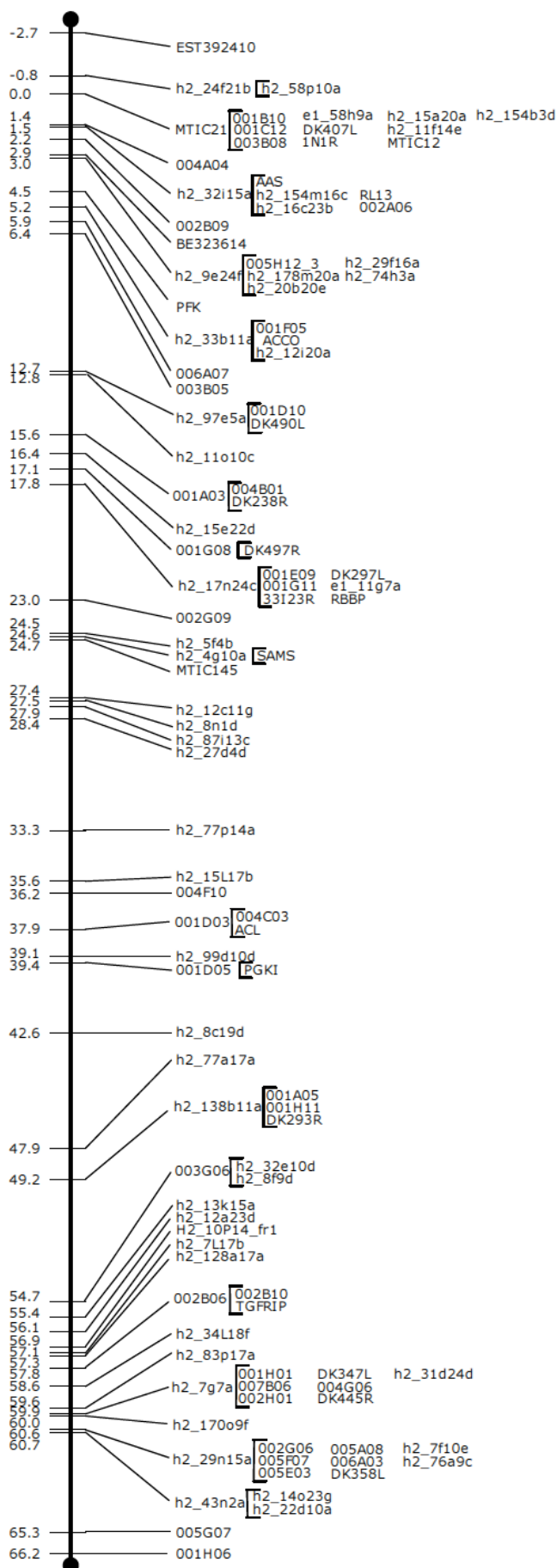


Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 1  
(University of Minnesota - 2006)

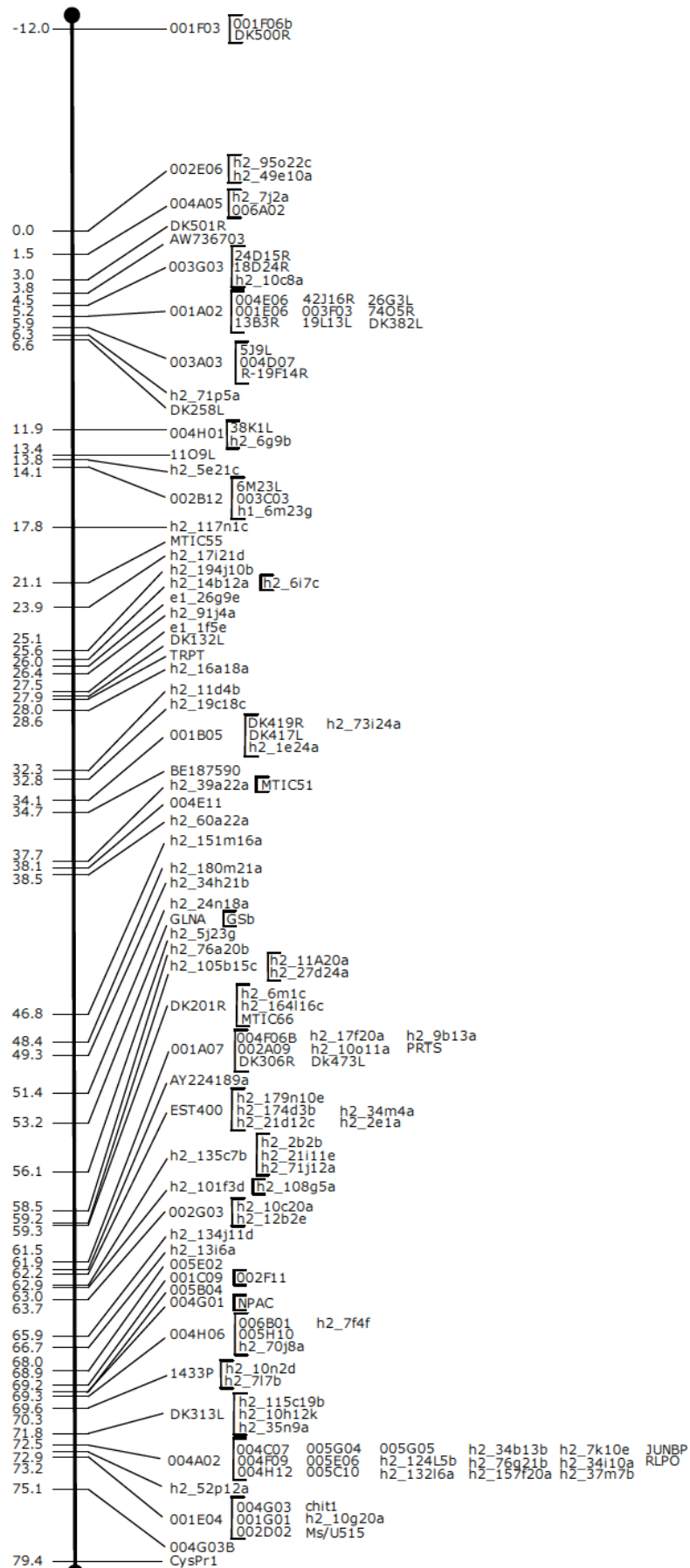
Annexe 1 : Carte  
consensus génétique-  
physique UMN



**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 2  
(University of Minnesota - 2006)**

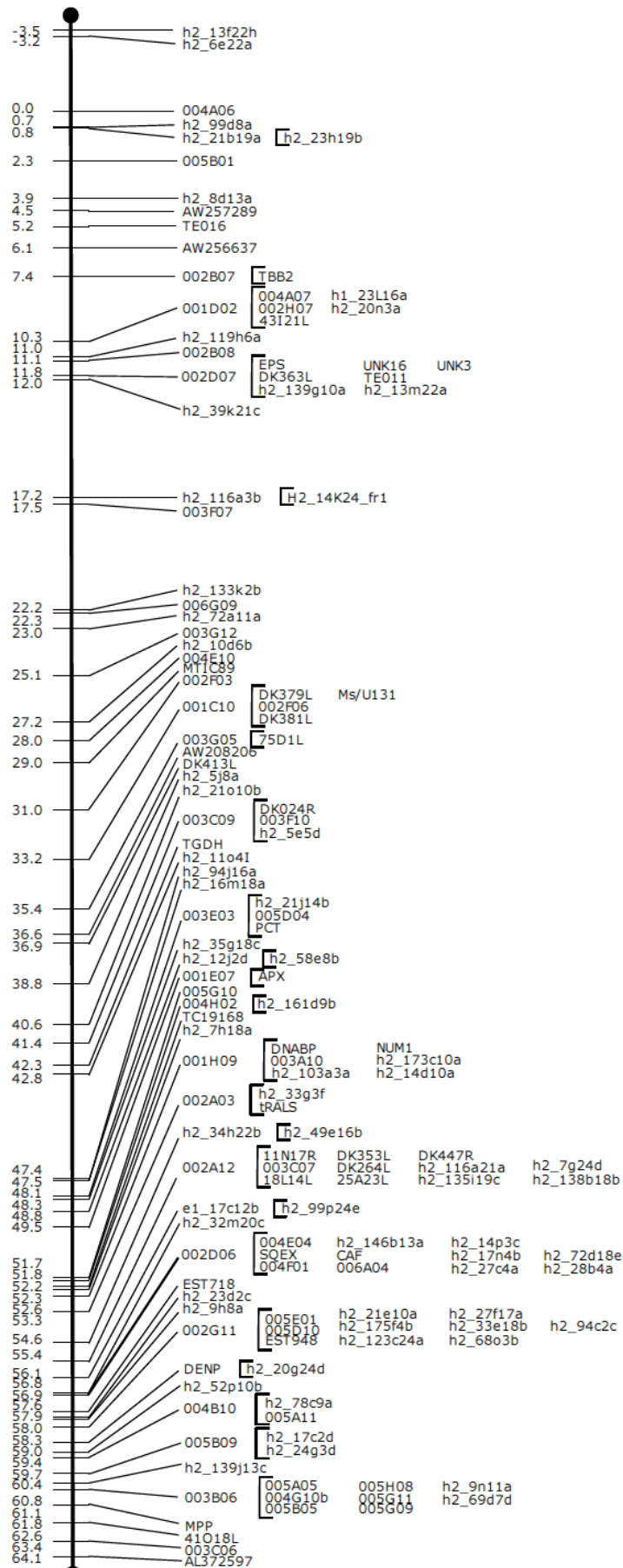


**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 3  
(University of Minnesota - 2006)**

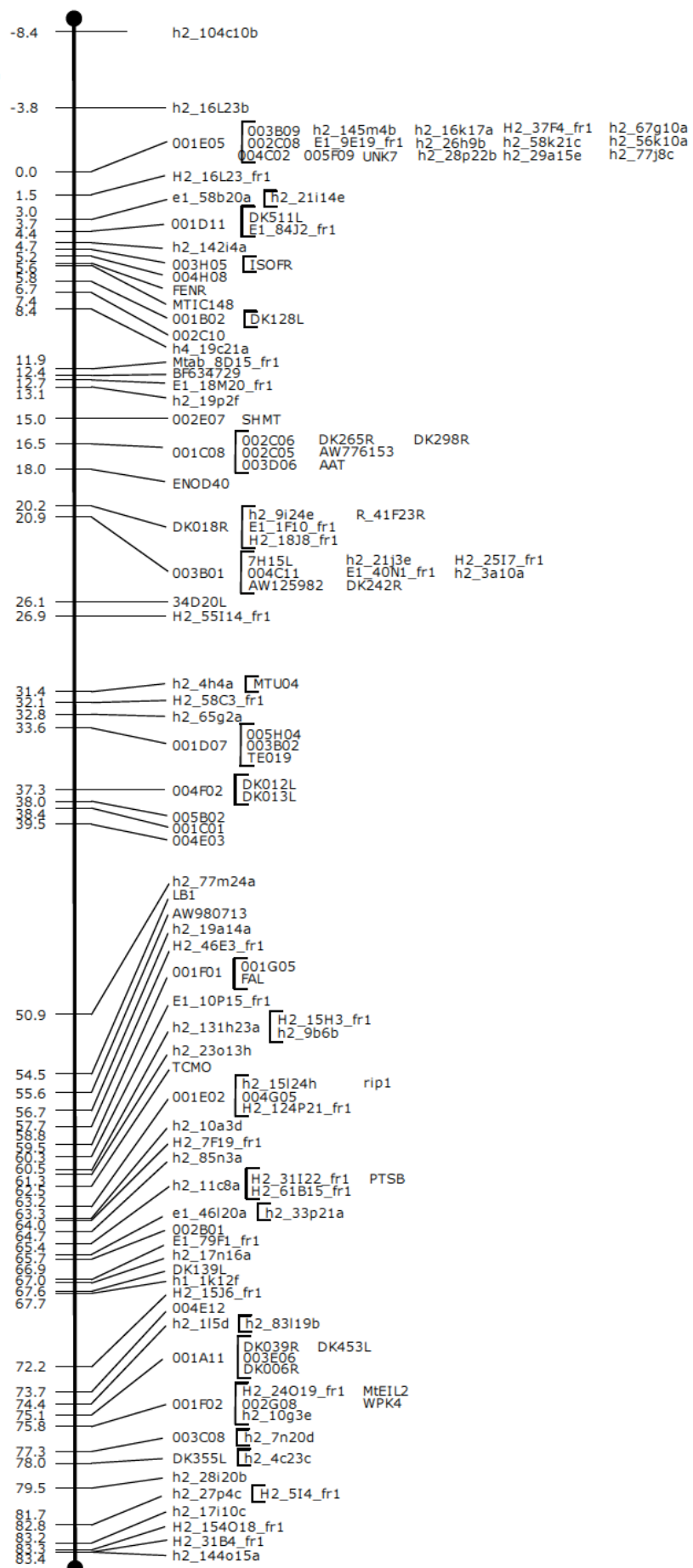




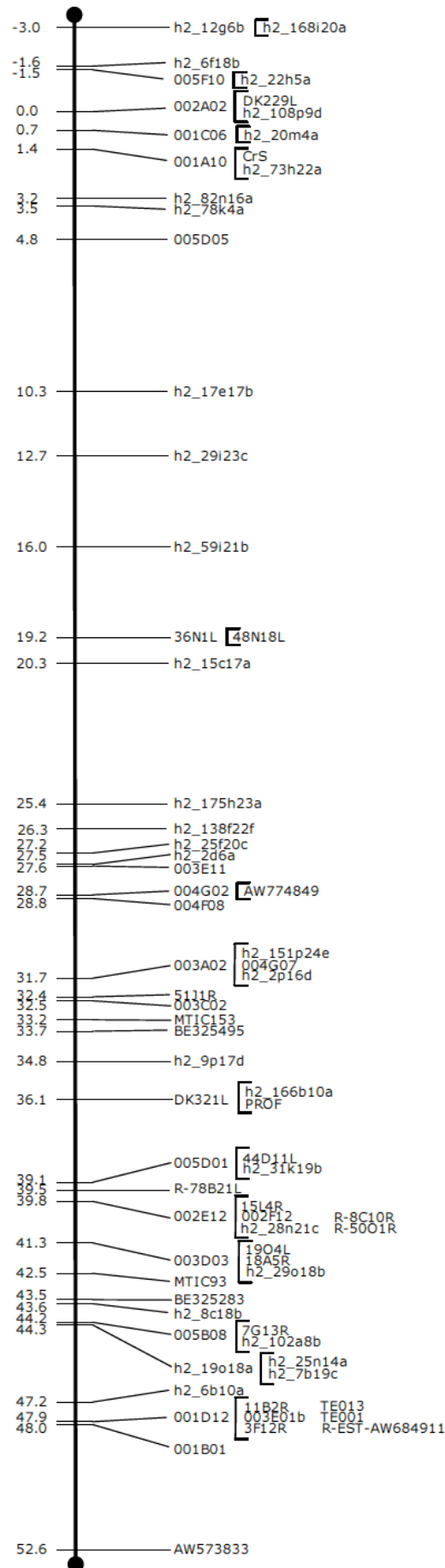
**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 4  
(University of Minnesota - 2006)**



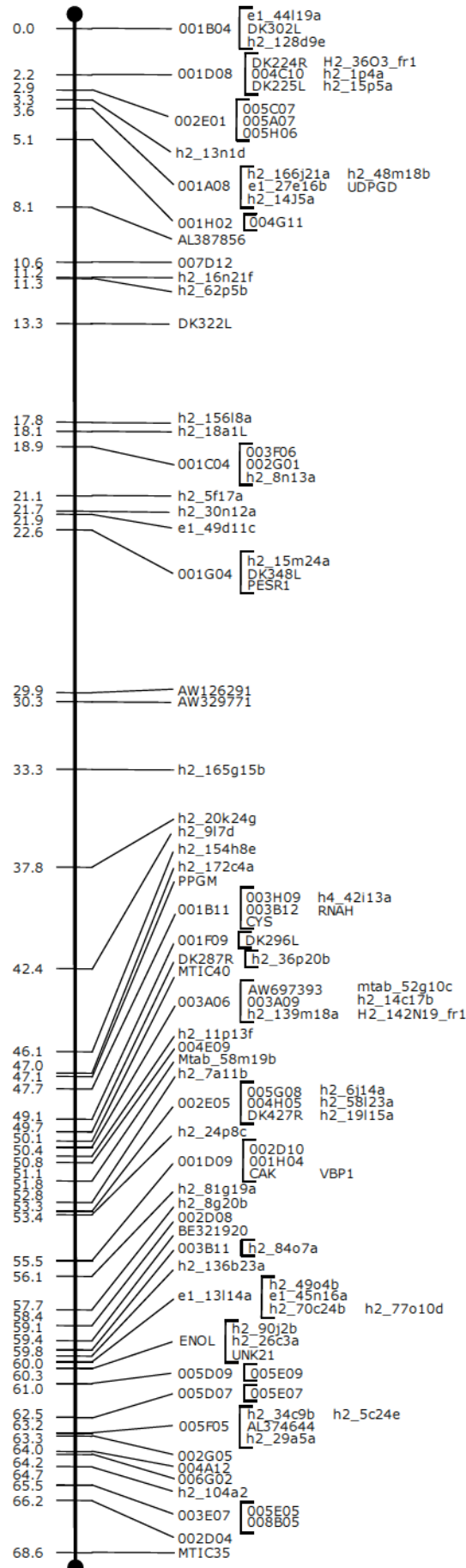
**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 5  
(University of Minnesota - 2006)**



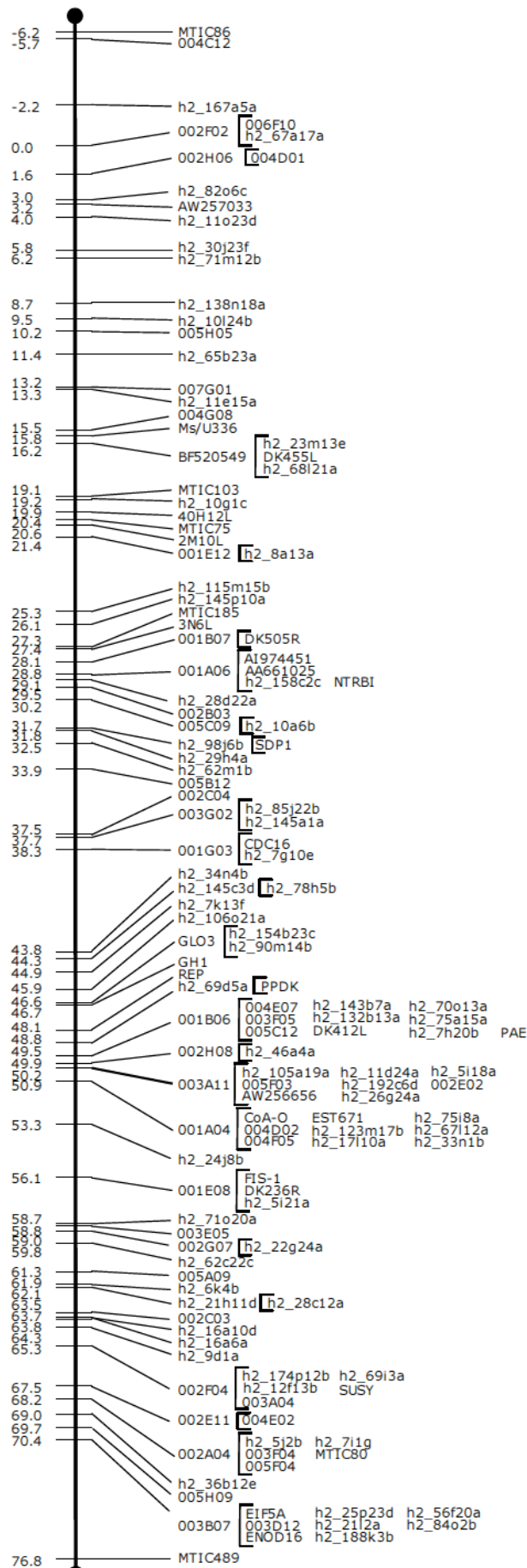
**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 6  
(University of Minnesota - 2006)**



**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 7  
(University of Minnesota - 2006)**

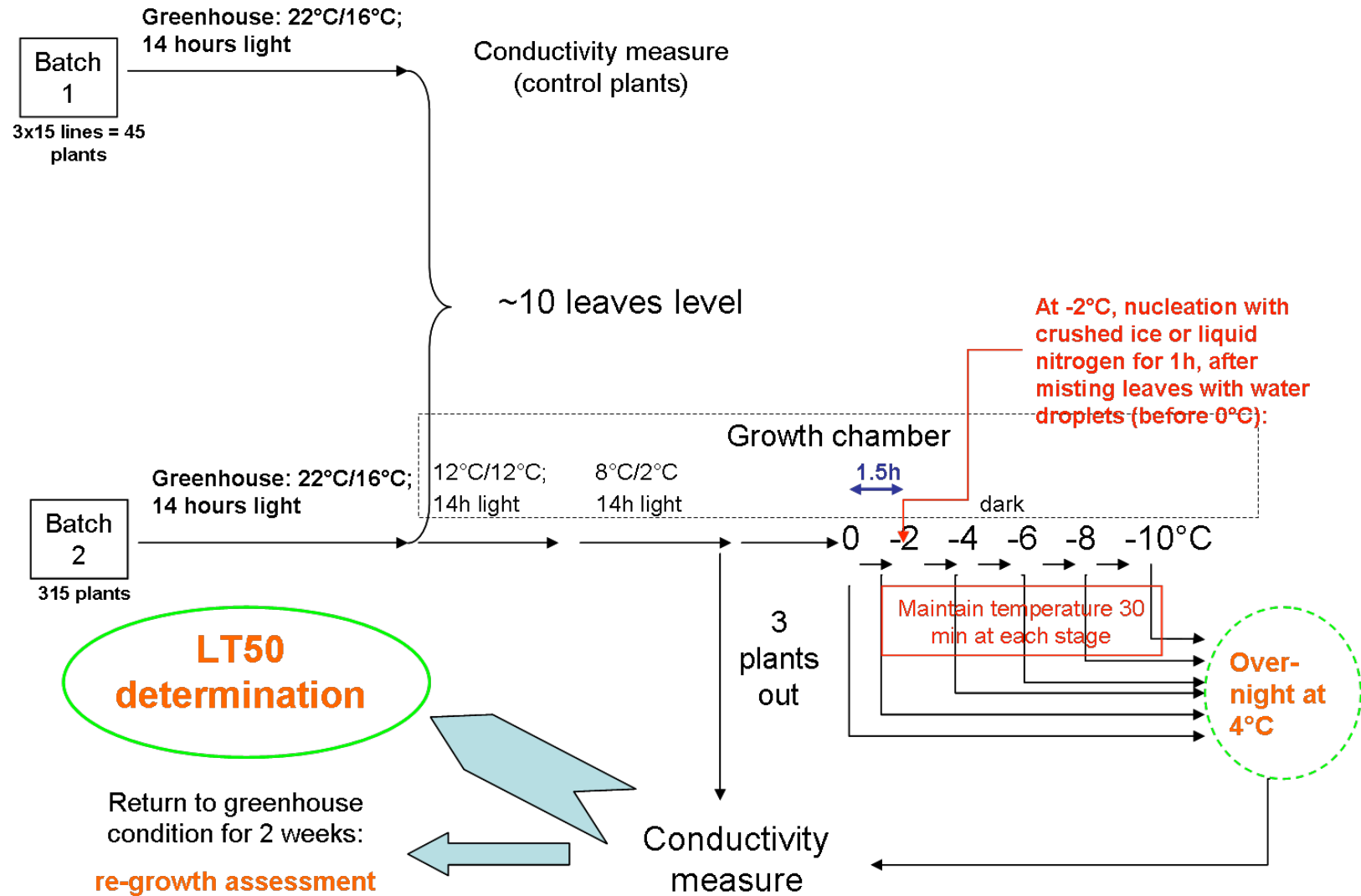


**Integrated Genetic Map  
of *Medicago truncatula*  
Chromosome 8  
(University of Minnesota - 2006)**



## Annexe 2

## Protocol for determination of $LT_{50}$ in 15 core-collection lines of *Medicago truncatula*





# **Références bibliographiques**





## Références bibliographiques

- A**dams WW, Hoehn A, Demmigadams B (1995) Chilling Temperatures and the Xanthophyll Cycle - a Comparison of Warm-Grown and Overwintering Spinach. *Aust J Plant Physiol* **22**: 75-85
- Agarwal PK, Parinita A, Reddy MK, Sopory SK** (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* **25**: 1263-1274
- Aitken Y** (1955) Flower initiation in pasture legumes. III. Flower initiation in *Medicago tribuloides* Desr. and other annual medics. *Aust J Agric Res* **6**: 258-264
- Al-Shoaibi AA** (2007) Growth response of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and Zea mays to chilling temperature. *Biosciences Biotechnology Research Asia* **4**: 389-394
- Albrecht V, Weini S, Blazevic D, D'Angelo C, Batistic O, Kolukisaoglu U, Bock R, Schulz B, Harter K, Kudla J** (2003) The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant J* **36**: 457-470
- Allen DJ, Ratner K, Giller YE, Gussakovsky EE, Shahak Y, Ort DR** (2000) An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *J Exp Bot* **51**: 1893-1902
- Alonso-Blanco C, Gomez-Mena C, Llorente F, Koornneef M, Salinas J, Martinez-Zapater JM** (2005) Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1304-1312
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK** (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem* **278**: 40882-40889
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Ameline-Torregrosa C, Wang B-B, O'Bleness MS, Deshpande S, Zhu H, Roe B, Young ND, Cannon SB** (2008) Identification and Characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in the Model Plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **146**: 5-21
- Ané J-M, Zhu H, Frugoli J** (2008) Recent Advances in *Medicago truncatula* Genomics. *International Journal of Plant Genomics* **2008**
- Annicchiarico P, Collins RP, Fornasier F, Rhodes I** (2001) Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. *Euphytica* **122**: 407-416
- Aro EM, Virgin I, Andersson B** (1993) Photoinhibition of Photosystem-2 - Inactivation, Protein Damage and Turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**: 113-134
- Asada K** (1996) Radical production and scavenging in the chloroplasts. *In* NR Baker, ed, *Advances in Photosynthesis. Photosynthesis and the Environment Vol (vol.5)*. Kluwer, pp 123-150
- Asghari A, Mohammadi SA, Moghaddam M, Mohammaddoost HR** (2007) QTL analysis for cold resistance-related traits in *Brassica napus* using RAPD markers. *J Food Agric Env* **5**: 188-192
- Ashworth EN, Davis GA, Anderson JA** (1985) Factors affecting ice nucleation in plant tissues. *Plant Physiol* **79**: 1033-1037

- Ashworth EN, Echlin P, Pearce RS, Hayes TL** (1988) Ice formation and tissue response in apple twigs. *Plant, Cell & Environment* **11**: 703-710
- Aubert G, Morin J, Jacquin F, Loridon K, Quillet MC, Petit A, Rameau C, Lejeune-Hénaut I, Huguet T, Burstin J** (2006) Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet* **112**: 1024-1041
- Avia K, Pilet M-L, Bahrman N, Baranger A, Fontaine V, Hamon C, Hanocq E, Niarquin M, Sellier H, Vuylsteker C, Prospero J-M, Lejeune-Hénaut I** (2008) Freezing tolerance in *Medicago truncatula* accessions and QTL for freezing damage colocalizing with related physiological traits (Submitted). *Plant Physiol*
- B** **adger MR, Price GD** (1992) The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol Plant* **84**: 606-615
- B** **aga M, Chodaparambil SV, Limin AE, Pecar M, Fowler DB, Chibbar RN** (2007) Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Funct Integr Genomics* **7**: 53-68
- Ballare CL** (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends Plant Sci* **4**: 97-102
- Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D** (2003) Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall Continuum in Plants. *Emerging Links Revisited*. *Plant Physiol* **133**: 482-491
- Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattee Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Genier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Denarie J, Huguet T** (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Report* **8**: 40-49
- Barsch A, Carvalho HG, Cullimore JV, Niehaus K** (2006) GC-MS based metabolite profiling implies three interdependent ways of ammonium assimilation in *Medicago truncatula* root nodules. *J Biotechnol* **127**: 79-83
- Baskin TI** (2000) The cytoskeleton. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 202-258
- Basra AS, Basra RK** (1997) *Mechanisms of environmental stress resistance in plants*. Australia: Harwood Academic Pub.
- Bauer H, Nagele M, Comploj M, Galler V, Mair M, Unterpertinger E** (1994) Photosynthesis in cold acclimated leaves of plants with various degrees of freezing tolerance. *Physiol Plant* **91**: 403-412
- Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Tribikuum B** (2007) Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* **32**: 501-510
- Bedi S, Basra AS** (1993) Chilling injury in germinating seeds: basic mechanisms and agricultural implications. *Seed Sci Res* **3**: 219-229
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* **57**: 289-300

- Benlloch R, Navarro C, Beltran JP, Canas LA** (2003) Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sex Plant Reprod* **15**: 231-241
- Berry J, Bjorkman O** (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 491-543
- Berry JO, Breiding DE, Klessig DF** (1990) Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *Plant Cell* **2**: 795
- Bertrand A, Prevost D, Bigras FJ, Castonguay Y** (2007) Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> and Strain of *Rhizobium* Alter Freezing Tolerance and Cold-induced Molecular Changes in Alfalfa (*Medicago sativa*). *Ann Bot* **99**: 275
- Biber PD** (2007) Evaluating a Chlorophyll Content Meter on Three Coastal Wetland Plant Species. *Journal of Agriculture, Food & Environmental Sciences* **1**
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504
- Blondon F, Marie D, Brown S, Kondorosi A** (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* **37**: 264-270
- Bohn M, Luthje S, Sperling P, Heinz E, Dorffling K** (2007) Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *J Plant Physiol* **164**: 146-156
- Bohnert HJ, Ayoubi P, Borchert C, Bressan RA, Burnap RL, Cushman JC, Cushman MA, Deyholos M, Fischer R, Galbraith DW, Hasegawa PM, Jenks M, Kawasaki S, Koiwa H, Kore-eda S, Lee B, Michalowski CB, Misawa E, Nomura M, Ozturk N, Postier B, Prade R, Song C, Tanaka Y, Wang H, Zhu J** (2001) A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol Biochem* **39**: 295-311
- Bourion V, Lejeune-Henaut I, Munier-Jolain N, Salon C** (2003) Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *Eur J Agron* **19**: 535-548
- Boyer JS** (1982) Plant Productivity and Environment. *Science* **218**: 443-448
- Braam J** (1992) Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured *Arabidopsis* cells: induction by calcium and heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3213-3216
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brandon DL, Corse J, Higaki PC, Zavala ME** (1992) Monoclonal antibodies for analysis of cytokinin O-glucosides in response to cold stress. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. Edited by Kamínek, M., Zazimalová, E. and Mok, DWS: 447-453
- Brandriss MC, Magasanik B** (1979) Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *J Bacteriol* **140**: 498
- Brandsaeter LO, Olsmo A, Tronsmo AM, Fykse H** (2002) Freezing resistance of winter annual and biennial legumes at different developmental stages. *Crop Sci* **42**: 437-443
- Brandts JF** (1969) Conformational transitions of proteins in water and in aqueous mixtures. *In* SN Timasheff, GD Fasman, eds, *Structure and Stability of Biological Molecules*. Marcel Dekker, New-York, pp 213-290

- Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martinez J, Alberdi M, Close TJ, Corcuera LJ** (2003) Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol Plant* **118**: 262-269
- Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA, Sumner LW** (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot* **56**: 323-336
- Brouwer DJ, Duke SH, Osborn TC** (2000) Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa. *Crop Sci* **40**: 1387-1396
- Bruggemann W, Kooij TAWvd, Hasselt PRv** (1992) Long-term chilling of young tomato plants under low light and subsequent recovery. I. Growth, development and photosynthesis. *Planta* **186**: 172-178
- Bubier J, Schlappi M** (2004) Cold induction of EARLI1, a putative *Arabidopsis* lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ* **27**: 929-936
- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH** (1976) Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **27**: 507-528
- Busk PK, Pages M** (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* **37**: 425-435
- C**alenge F, Saliba-Colombani V, Mahieu S, Loudet O, Daniel-Vedele F, Krapp A (2006) Natural variation for carbohydrate content in *Arabidopsis*. Interaction with complex traits dissected by quantitative genetics. *Plant Physiol* **141**: 1630-1643
- Callis J, Vierstra RD** (2000) Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 381-386
- Cameron RWF, Dixon GR** (2000) The influence of temperature, daylength and calendar date on cold tolerance of *Rhododendron*. *J Hortic Sci Biotechnol* **75**: 481-487
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V** (1998) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **329**: 719
- Cao S, Ye M, Jiang S** (2005) Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **24**: 683-690
- Cao SQ, Song YQ, Su L** (2007) Freezing sensitivity in the gigantea mutant of *Arabidopsis* is associated with sugar deficiency. *Biol Plant (Prague)* **51**: 359-362
- Chabaud M, Larsonneau C, Marmouget C, Huguet T** (1996) Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Rep* **15**: 305-310
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* **30**: 239-264
- Cheesbrough TM** (1989) Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. *Plant Physiol* **90**: 760-764
- Chen THH, Gusta LV** (1983) Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiol* **73**: 71-75

- Chen THH, Gusta LV, Fowler DB** (1983) Freezing injury and root development in winter cereals. *Plant Physiol* **73**: 773-777
- Chen WQ, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T** (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**: 559-574
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J** (2002) Calcium signaling through protein kinases. The arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* **129**: 469-485
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong XH, Agarwal M, Zhu JK** (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev* **17**: 1043-1054
- Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK** (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol Plant* **126**: 52-61
- Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci* **12**: 444-451
- Choi H-i, Hong J-h, Ha J-o, Kang J-y, Kim SY** (2000) ABFs, a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. *J Biol Chem* **275**: 1723-1730
- Choi H-K, Luckow M, Doyle J, Cook D** (2006) Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *MGG Mol Genet Genomics* **276**: 56-70
- Choi HK, Kim DJ, Uhm TS, Limpens E, Lim HJ, Mun JH, Kalo P, Penmetza RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR** (2004a) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**: 1463-1502
- Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu HY, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR** (2004b) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15289-15294
- Chrispeels MJ, Raikhel NV** (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell* **3**: 1
- Christov N, Yoneyama S, Shimamoto Y, Imai R** (2007) Differential expression of wheat genes during cold acclimation. *Cytology and Genetics* **41**: 142-150
- Churchill GC, Reaney MJT, Gusta LV** (1994) Molecular modeling of the (S)-ABA binding site of the receptor involved in the induction of freezing tolerance: a hypothetical receptor model. *J Plant Growth Regul* **13**: 173-181
- Clarkson NM, Russell JS** (1975) Flowering responses to vernalization and photoperiod in annual medics (*Medicago* spp.). *Aust J Agric Res* **26**: 831-838
- Close TJ** (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* **97**: 795-803
- Close TJ** (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* **100**: 291
- Cook DR** (1999) *Medicago truncatula* - a model in the making! *Curr Opin Plant Biol* **2**: 301-304

**Craig KL, Tyers M** (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **72**: 299-328

**Crosatti C, Pagani D, Cattivelli L, Stanca AM, Rizza F** (2008) Effects of growth stage and hardening conditions on the association between frost resistance and the expression of the cold-induced protein COR14b in barley. *Environ Exp Bot* **62**: 93-100

**d** 'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P (2003) Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology* **34**: 95-106

**Daniel V** (1993) Glutathione S-Transferases: Gene Structure and Regulation of Expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 173-207

**Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F** (2003) TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiol* **132**: 1849-1860

**Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F** (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* **10**: 623-638

**Davidson BR, Davidson HF** (1993) Legumes: the Australian experience. Research Studies Press, Taunton, UK

**de Lorenzo L, Merchan F, Blanchet S, Megias M, Frugier F, Crespi M, Sousa C** (2007) Differential expression of the TFIIIA regulatory pathway in response to salt stress between *Medicago truncatula* genotypes(1[W]). *Plant Physiol* **145**: 1521-1532

**Demmig-Adams B, Adams WW, III** (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 599-626

**Dexter ST, Tottingham WE, Graber LF** (1930) Preliminary results in measuring the hardiness of plants. *Plant Physiol* **5**: 215-223

**Ding JP, Pickard BG** (1993) Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. *Plant J* **3**: 713

**Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15

**Doyle JJ, Luckow MA** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900-910

**Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* **33**: 751-763

**Duke SH, Doehlert DC** (1981) Root respiration, nodulation, and enzyme activities in alfalfa during cold acclimation. *Crop Sci* **21**: 489-495

**E** dwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* **5**: 193-198

- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863
- Ensminger I, Busch F, Huner NPA** (2006) Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiol Plant* **126**: 28-44
- Etzler ME** (1985) Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. *Annual Reviews in Plant Physiology* **36**: 209-234
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR** (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* **4**: 17-31
- Farag MA, Huhman DV, Lei ZT, Sumner LW** (2007) Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochemistry* **68**: 342-354
- Fedorova M, Mortel Jvd, Matsumoto PA, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Gantt JS, Vance CP** (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **130**: 519-537
- Flinn CL, Ashworth EN** (1994) Seasonal changes in ice distribution and xylem development in blueberry flower buds. *J Am Soc Hortic Sci* **119**: 1176-1184
- Foucher F, Morin J, Courtiade J, Cadioux S, Ellis N, Banfield MJ, Rameau C** (2003) DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell* **15**: 2742-2754
- Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F** (2001) Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiol* **127**: 1676-1681
- Fowler DB, Chauvin LP, Limin AE, Sarhan F** (1996a) The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye. *Theor Appl Genet* **93**: 554-559
- Fowler DB, Limin AE, Wang S, Ward RW** (1996b) Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Can J Plant Sci* **76**: 37-42
- Fowler S, Thomashow MF** (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**: 1675-1690
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ** (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **92**: 696-717
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Toth B, Hayes PM, Skinner JS, Pecchioni N** (2004) Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theor Appl Genet* **108**: 670-680
- Franks F** (1981) Biophysics and biochemistry of low temperatures and freezing. *In* GJ Morris, A Clarke, eds, *Effects of low temperatures on biological membranes* Academic Press, London, UK, pp 3-19
- Fraser P** (2006) Transcriptional control thrown for a loop. *Curr Opin Genet Dev* **16**: 490-495



**Frugoli J, Harris J** (2001) *Medicago truncatula* on the move! *The Plant Cell* **13**: 458-463

**Fuller MP, Wisniewski M** (1998) The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol* **23**: 81-89

**Gallardo K, Signor CI, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J** (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol* **133**: 664-682

**Garaeva LD, Pozdeeva SA, Timofeeva OA, Khokhlova LP** (2006) Cell-wall lectins during winter wheat cold hardening. *Russ J Plant Physiol* **53**: 746-750

**Gilmour SJ, Fowler SG, Thomashow MF** (2004) Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol Biol* **54**: 767-781

**Gilmour SJ, Hajela RK, Thomashow MF** (1988) Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **87**: 745

**Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF** (2000) Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* **124**: 1854-1865

**Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF** (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* **16**: 433

**Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris PC, Bouvier-Durand M, Vartanian N** (1994) Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* **26**: 1557-1577

**Gollan T, Passioura JB, Munns R** (1986) Soil water status affects stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Aust J Plant Physiol* **13**: 459-464

**Gomez L, Allona I, Ramos A, Nunez P, Ibanez C, Casado R, Aragoncillo C** (2005) Molecular responses to thermal stress in woody plants. *Investigacion Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* **14**: 307-317

**Gong DM, Guo Y, Schumaker KS, Zhu JK** (2004) The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**: 919-926

**Gould KS, Kuhn DN, Lee DW, Oberbauer SF** (1995) Why Leaves Are Sometimes Red. *Nature* **378**: 241-242

**Graham D, Patterson BD** (1982) Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 347-372

**Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* **131**: 872-877

**Gray GR, Savitch LV, Ivanov AG, Huner NPA** (1996) Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. II. Adjustment of photosynthetic capacity in winter wheat and winter rye. *Plant Physiol* **110**: 61-71

**Griffith M, Antikainen M** (1996) Extracellular ice formation in freezing-tolerant plants. *Adv Low-Temp Biol* **3**: 107-139

- Griffith M, McLntyre HCH** (1993) The interrelationship of growth and frost tolerance in winter rye. *Physiol Plant* **87**: 335-344
- Guo Y, Xiong LM, Ishitani M, Zhu JK** (2002) An Arabidopsis mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7786-7791
- Gusta LV, Trischuk R, Weiser CJ** (2005) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. *J Plant Growth Regul* **24**: 308-318
- Gusta LV, Wisniewski M, Nesbitt NT, Tanino KT** (2003) Factors to consider in artificial freeze tests. *Acta Horticulturae*: 493-507
- Gutierrez MV, Patto MCV, Huguet T, Cubero JI, Moreno MT, Torres AM** (2005) Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theor Appl Genet* **110**: 1210-1217
- Guy CL** (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 187
- Guy CL, Huber JLA, Huber SC** (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol* **100**: 502-508
- Haagensohn DM, Cunningham SM, Joern BC, Volenec JJ** (2003) Autumn defoliation effects on alfalfa winter survival, root physiology, and gene expression. *Crop Sci* **43**: 1340-1348
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ** (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 639-648
- Hahn M, Walbot V** (1989) Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiol* **91**: 930-938
- Halliwell B** (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**: 312-322
- Halliwell B, Whiteman M** (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**: 231-255
- Hannah MA, Wiese D, Freund S, Fiehn O, Heyer AG, Hinch DK** (2006) Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**: 98-112
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T** (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* **217**: 290-298
- Hara M, Terashima S, Kuboi T** (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. *J Plant Physiol* **158**: 1333-1339
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF** (2000) CDPKs - a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? *Trends Plant Sci* **5**: 154-159
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY** (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429

- Hecht V, Foucher F, Ferrandiz C, Macknight R, Navarro C, Morin J, Vardy ME, Ellis N, Beltran JP, Rameau C, Weller JL** (2005) Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiol* **137**: 1420-1434
- Heerden JMv** (1984) Influence of temperature and daylength on the phenological development of annual Medicago species with particular reference to *M. truncatula*, cv. Jemalong. *S Afr J Plant Soil* **1**: 73-78
- Heino P, Palva E** (2003) Signal transduction in plant cold acclimation. *In* *Plant Responses to Abiotic Stress*, pp 151-186
- Hekneby M, Antolin MC, Sanchez-Diaz M** (2001) Cold response of annual Mediterranean pasture legumes. *Options Méditerranéennes. Serie A, Séminaires Méditerranéens*: 157-161
- Hekneby M, Antolin MC, Sanchez-Diaz M** (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environ Exp Bot* **55**: 305-314
- Henderson IR, Dean C** (2004) Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. *Development* **131**: 3829-3838
- Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK** (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol* **130**: 675-687
- Hilu KW, Liang H** (1997) The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *Am J Bot* **84**: 830-830
- Hincha DK, Pfüller U, Schmitt JM** (1997) The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album* L.) leaves is correlated with leaf frost hardiness. *Planta* **203**: 140-144
- Hirsh AG, Williams RJ, Meryman HT** (1985) A novel method of natural cryoprotection: intracellular glass formation in deeply frozen *Populus*. *Plant Physiol* **79**: 41-56
- Hjelm U, Ogren E** (2003) Is photosynthetic acclimation to low temperature controlled by capacities for storage and growth at low temperature? Results from comparative studies of grasses and trees. *Physiol Plant* **119**: 113-120
- Hochman Z** (1987) Quantifying vernalization and temperature promotion effects on time of flowering of three cultivars of *Medicago truncatula* Gaertn. *Aust J Agric Res* **38**: 279-280
- Holaday AS, Martindale W, Alred R, Brooks AL, Leegood RC** (1992) Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiol* **98**: 1105-1114
- Holland JB, Nyquist WE, Cervantes-Martínez CT** (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. *Plant Breed Rev* **22**: 9-111
- Hon W, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DSC** (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* **109**: 879-889
- Hon WC, Griffith M, Chong P, Yang DSC** (1994) Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol* **104**: 971-980
- Hong SW, Jon JH, Kwak JM, Nam HG** (1997) Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **113**: 1203
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S, Sarhan F** (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J* **8**: 583-593

- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC** (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**: 666-680
- Hsieh T, Lee J, Yang P, Chiu L, Charng Y, Wang Y, Chan M** (2002) Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol* **129**: 1086-1094
- Huguet T** (2004) Genetic map of the *Medicago truncatula* LR4 population. [http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/GeneticMAP/LR4\\_MAP.html](http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/GeneticMAP/LR4_MAP.html) LIPM, Toulouse, France
- Huhman DV, Sumner LW** (2002) Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* **59**: 347-360
- Huner N, Williams J, Krol M, Boese S, Hurry V, Lapointe L, Reynolds T** (1989) Photosynthesis, low temperature development and freezing tolerance. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* **8**: 6-20
- Huner NPA, Oquist G, Hurry VM, Krol M, Falk S, Griffith M** (1993) Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth Res* **37**: 19-39
- Huner NPA, Oquist G, Sarhan F** (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci* **3**: 224
- Hurry VM, Huner NPA, Selstam E** (1998) Photosynthesis at low growth temperatures. *In* AS Raghavendra, ed, *Photosynthesis. A Comprehensive Treatise*. Cambridge University Press, pp 238-249
- Hurry VM, Malmberg G, Gardestrom P, Oquist G** (1994) Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). *Plant Physiol* **106**: 983-990
- Hurry VM, Strand A, Tobiaeson M, Gardestrom P, Oquist G** (1995) Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. *Plant Physiol* **109**: 697-706
- Hutchison RS, Groom Q, Ort DR** (2000) Differential Effects of Chilling-Induced Photooxidation on the Redox Regulation of Photosynthetic Enzymes. *Biochemistry* **39**: 6679-6688
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K** (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J* **24**: 655-665
- Imin N, Jong Fd, Mathesius U, Noorden Gv, Saeed NA, Wang X, Rose RJ, Rolfe BG** (2004) Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* **4**: 1883-1896
- Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 377

- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK** (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* **9**: 1935
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF** (1998) Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF** (2001) Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant Physiol* **127**: 910-917
- Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, Veisz O, Páldi E** (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci* **164**: 301-306
- Jehan B, Asghari B, Dominy P** (2006) The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. *J Exp Bot* **57**: 3707-3715
- Jensen AB, Goday A, Figueras M, Jessop AC, Pages M** (1998) Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant J* **13**: 691-697
- Jiang H, Howell GS, Flore JA** (1999) Efficacy of chlorophyll fluorescence as a viability test for freeze-stressed woody grape tissues. *Can J Plant Sci* **79**: 401-409
- Jiang Q, Gresshoff PM** (1997) Classical and molecular genetics of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 59-68
- Johnson JR, Havis JR** (1977) Photoperiod and temperature effects on root cold acclimation. *J Am Soc Hortic Sci* **102**: 306-308
- Johnson LA, Schultz JL, Soltis DE, Soltis PS** (1996) Monophyly and generic relationships of Polemoniaceae based on matK sequences. *Am J Bot* **83**: 1207-1224
- Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H** (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11274
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* **57**: 19-53
- Joosen RVL, Lammers M, Balk PA, Bronnum P, Konings MCJM, Perks M, Stattin E, Wordragen MFv, Geest AHMvd** (2006) Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiol* **26**: 1297-1313
- Journet EP, Tuinen Dv, Gouzy J, Crespeau H, Carreau V, Farmer MJ, Niebel A, Schiex T, Jaillon O, Chatagnier O, Godiard L, Micheli F, Kahn D, Gianinazzi-Pearson V, Gamas P** (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res* **30**: 5579-5592
- Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T, Huyghe C** (2003) Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol* **3** (9)

- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre JB, Prosperi JM, Barre P, Huyghe C** (2007) Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet* **114**: 1391-1406
- K**acperska A (2004) Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiol Plant* **122**: 159-168
- Kahraman A, Kusmenoglu I, Aydin N, Aydogan A, Erskine W, Muehlbauer FJ** (2004) QTL mapping of winter hardiness genes in lentil. *Crop Sci* **44**: 13-22
- Kajita T, Ohashi H, Tateishi Y, Bailey CD, Doyle JJ** (2001) *rbcL* and Legume Phylogeny, with Particular Reference to Phaseoleae, Millettieae, and Allies. *Syst Bot* **26**: 515-536
- Kalma JD, Laughlin GP, Caprio JM, Hamer PJC** (1992) Advances in Bioclimatology. Vol. 2: The Bioclimatology of Frost. *In*. Berlin: Springer-Verlag, 144pp
- Kanervo E, Suorsa M, Aro EM** (2005) Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane. *Photochemical and Photobiological Sciences* **4**: 1072-1080
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol* **45**: 346-350
- Kautsky H, Hirsch A** (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Die Naturwissenschaften* **19**: 964-964
- Kiegle E, Moore CA, Haseloff J, Tester MA, Knight MR** (2000) Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J* **23**: 267-278
- Kim H, Hyun Y, Park J, Park M, Park M, Kim M, Kim H, Lee M, Moon J, Lee I, Kim J** (2004) A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **36**: 167-171
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO** (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* **25**: 247-259
- Kim KN, Cheong YH, Gupta R, Luan S** (2000) Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol* **124**: 1844-1853
- Kingston-Smith AH, Harbinson J, Foyer CH** (1999) Acclimation of photosynthesis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and antioxidants in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures. *Plant Cell Environ* **22**: 1071-1083
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **35**: 225-231
- Klahre U, Crete P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Meins F, Jr.** (2002) High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11981-11986
- Klimecka M, Muszynska G** (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* **54**: 219-234

- Klosson RJ, Krause GH** (1981) Freezing injury in cold-acclimated and unhardened spinach leaves. II. Effects of freezing on chlorophyll fluorescence and light scattering reactions. *Planta* **151**: 347-352
- Knight H, Knight MR** (2000) Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **51**: 1679-1686
- Knight H, Knight MR** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262-267
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR** (1996) Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**: 489-503
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ** (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature (London)* **352**: 524-526
- Kochert G** (1992) Rice as a model system. *In* Grass evolution and domestication., pp 290-315
- Kocsy G, Galiba G, Brunold C** (2001) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol Plant* **113**: 158-164
- Kocsy G, Szalai G, Vágújfalvi A, Stéhli L, Orosz G, Galiba G** (2000) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* **210**: 295-301
- Kolukisaoglu U, Weigl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J** (2004) Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**: 43-58
- Komatsu S, Yang G, Khan M, Onodera H, Toki S, Yamaguchi M** (2007) Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. *MGG Mol Genet Genomics* **277**: 713-723
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT** (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum* **51**: 601-617
- Krause GH, Weis E** (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 313-349
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiol* **130**: 2129-2141
- Krieger-Liszkay A** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* **56**: 337-346
- Krol M, Gray GR, Hurry VM, Oquist G, Malek L, Huner NPA** (1995) Low-Temperature Stress and Photoperiod Affect an Increased Tolerance to Photoinhibition in *Pinus-Banksiana* Seedlings. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **73**: 1119-1127
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 4718-4723
- Kulikova O, Gualtieri G, Geurts R, Kim DJ, Cook D, Huguet T, de Jong JH, Fransz PF, Bisseling T** (2001) Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *Plant J* **27**: 49-58
- Kurkela S, Franck M, Heino P, Lng V, Palva ET** (1988) Cold induced gene expression in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Rep* **7**: 495

- Kwak KJ, Kim JY, Kim YO, Kang H** (2007) Characterization of Transgenic Arabidopsis Plants Overexpressing High Mobility Group B Proteins under High Salinity, Drought or Cold Stress. *Plant Cell Physiol* **48**: 221-231
- L** **abate CA, Leegood RC** (1988) Limitation of photosynthesis by changes in temperature. *Planta* **173**: 519-527
- L** **aisk A, Oja V** (2000) Electron transport through photosystem II in leaves during light pulses: acceptor resistance increases with nonphotochemical excitation quenching. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1460**: 255-267
- Lamblin AFJ, Crow JA, Johnson JE, Silverstein KAT, Kunau TM, Kilian A, Benz D, Stromvik M, Endre G, VandenBosch KA, Cook DR, Young ND, Retzel EF** (2003) MtDB: a database for personalized data mining of the model legume *Medicago truncatula* transcriptome. *Nucleic Acids Res* **31**: 196-201
- Lang P, Zhang C-k, Ebel RC, Dane F, Dozier WA** (2005) Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene* **359**: 111-118
- Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, Palva ET** (1994) Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **104**: 1341-1349
- Lang V, Palva ET** (1992) The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* **20**: 951-962
- Lásztity D, Rácz I, Páldi E** (1999) Effect of long periods of low temperature exposure on protein synthesis activity in wheat seedlings. *Plant Sci* **149**: 59-62
- Laucou V, Haurogne K, Ellis N, Rameau C** (1998) Genetic mapping in pea. 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theor Appl Genet* **97**: 905-915
- Lee BH, Henderson DA, Zhu JK** (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* **17**: 3155-3175
- Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu J** (2001) The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev* **15**: 912-924
- Lee H, Xiong L, Ishitani M, Stevenson B, Zhu J** (1999) Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Plant J* **17**: 301-308
- Lee TI, Young RA** (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**: 77-137
- Lejeune-Hénaut I, Bourion V, Eteve G, Cunot E, Delhay K, Desmyter C** (1999) Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. *Euphytica* **109**: 201-211
- Lejeune-Henaut I, Delbreil B, Devaux R, Guillioni L** (2005) Temperatures froides et fonctionnement d'un couvert de pois. In N Munier-Jolain, V Biarnès, I Chaillet, J Lecoœur, M-L Jeuffroy, eds, *Agrophysiologie du pois protéagineux*. INRA, Paris, pp 184-195
- Lejeune-Hénaut I, Hanocq E, Béthencourt L, Fontaine V, Delbreil B, Morin J, Petit A, Devaux R, Boilleau M, Stempniak JJ, Thomas M, Lainé AL, Foucher F,**



- Baranger A, Burstin J, Rameau C, Giauffret C** (2008) The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theor Appl Genet* **116**: 1105-1116
- Levitt J** (1980) Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press., New York, USA
- Lewis G, Schire B, Mackinder B, Lock M** (2005) Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew
- Li C, Junttila O, Heino P, Palva ET** (2003a) Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application. *Tree Physiol* **23**: 481-487
- Li C, Puhakainen T, Welling A, Vihera-Aarnio A, Ernstsen A, Junttila O, Heino P, Palva ET** (2002) Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*). Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. *Physiol Plant* **116**: 478-488
- Li C, Wu N, Liu S** (2005) Development of freezing tolerance in different altitudinal ecotypes of *Salix paraplesia*. *Biologia Plantarum* **49**: 65-71
- Li H, Chang C, Lu L, Liu C, Chan M, Charng Y** (2003b) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor gene (*AtHsf1b*) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. *Bot Bull Acad Sin (Taipei)* **44**: 129-140
- Li R, Sosa JL, Zavala ME** (2000) Accumulation of zeatin O-glycosyltransferase in *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays* following cold stress. *Plant Growth Regulation* **32**: 295-305
- Limin AE, Fowler DB** (2002) Developmental traits affecting low-temperature tolerance response in near-isogenic lines for the vernalization locus *Vrn-A1* in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Ann Bot* **89**: 579-585
- Limin AE, Fowler DB** (2006) Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta* **224**: 360-366
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science (Washington)* **302**: 630-633
- Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaan B, Franssen H, Bisseling T, Geurts R** (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **55**: 983-992
- Lincoln S, Daly M, Lander E** (1992) Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. In Whitehead Institute Technical Report, 3rd edition, Cambridge, MA
- Liu J, Zhu J** (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science (Washington)* **280**: 1943-1945
- Lopez-Matas MA, Nunez P, Soto A, Allona I, Casado R, Collada C, Guevara MA, Aragoncillo C, Gomez L** (2004) Protein Cryoprotective Activity of a Cytosolic Small Heat Shock Protein That Accumulates Constitutively in Chestnut Stems and Is Up-Regulated by Low and High Temperatures. *Plant Physiol* **134**: 1708-1717
- Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Henaut I, Burstin J** (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* **111**: 1022-1031

- Loudet O, Chaillou S, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2003) Quantitative Trait Loci Analysis of Water and Anion Contents in Interaction With Nitrogen Availability in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **163**: 711-722
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W** (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* **14**: s389-s400
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG** (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot* **55**: 181-188
- Luit AHvd, Olivari C, Haley A, Knight MR, Trewavas AJ** (1999) Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol* **121**: 705-714
- Lundheim R** (2002) Physiological and ecological significance of biological ice nucleators. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **357**: 937-943
- Lyons JM** (1973) Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **24**: 445-466
- M** **abberley DJ** (1997) *The plant book*, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- MacRobbie EAC** (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **353**: 1475-1488
- Mahfoofi S, Limin AE, Farhad A, Fowler DB** (2006) Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field Crops Res* **97**: 182-187
- Mahfoofi S, Limin AE, Fowler DB** (2001) Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. *Crop Sci* **41**: 1006-1011
- Malkin R, Niyogi K** (2000) Photosynthesis. *In* BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (USA), p 1367pp
- Malone SR, Ashworth EN** (1991) Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron microscopy and freeze substitution techniques. *Plant Physiol* **95**: 871-881
- Marco Gd, Tricoli D** (1983) RuBP carboxylase determination by enzymic estimation of D-3-PGA formed. *Photosynth Res* **4**: 145-149
- Marisa L, Ichante JL, Reymond N, Aggerbeck L, Delacroix H, Mucchielli-Giorgi MH** (2007) MAnGO: an interactive R-based tool for two-colour microarray analysis. *Bioinformatics* **23**: 2339
- Marja-Liisa S** (2007) Lipid changes during cold-acclimation and de-acclimation of herbaceous and woody species. *In* E Taulavuori, K Taulavuori, eds, *Physiology of northern plants under changing environment*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp 19-37
- Martinez-Zapater JM, Coupland G, Dean C, Koornneef M** (1994) The transition to flowering in *Arabidopsis*. *In* EM Meyerowitz, CR Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, pp 403-433

- Martz F, Kiviniemi S, Palva TE, Sutinen ML** (2006) Contribution of omega-3 fatty acid desaturase and 3-ketoacyl-ACP synthase II (KASII) genes in the modulation of glycerolipid fatty acid composition during cold acclimation in birch leaves. *J Exp Bot* **57**: 897-909
- Mäser P, Leonhardt N, Schroeder JI** (2003) The Clickable Guard Cell: Electronically Linked Model of Guard Cell Signal Transduction Pathways. *The Arabidopsis Book*: 1-4
- Mathesius U, Mulders S, Gao MS, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD** (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1444-1449
- Matiru VN, Dakora FD** (2005) Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. *New Phytol* **165**: 847-855
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* **51**: 659-668
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S** (2000) Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**: 439-442
- Medina J, BARGUES M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J** (1999) The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol* **119**: 463-469
- Merchan F, Lorenzo Ld, Rizzo SG, Niebel A, Manyani H, Frugier F, Sousa C, Crespi M** (2007) Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *Plant J* **51**: 1-17
- Michaels SD, Amasino RM** (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949-956
- Mitra M, Lato SM, Ynalvez RA, Xiao Y, Moroney JV** (2004) Identification of a New Chloroplast Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **135**: 173-182
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K** (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol* **15**: 15-19
- Moffatt B, Ewart V, Eastman A** (2006) Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiol Plant* **126**: 5-16
- Monroy A, Dryanova A, Malette B, Oren D, Ridha Farajalla M, Liu W, Danyluk J, Ubayasena L, Kane K, Scoles G, Sarhan F, Gulick P** (2007) Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol Biol* **64**: 409-423
- Monroy AF, Castonguay Y, Laberge S, Sarhan F, Vezina LP, Dhindsa RS** (1993a) A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol* **102**: 873
- Monroy AF, Dhindsa RS** (1995) Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* **7**: 321
- Monroy AF, Sangwan V, Dhindsa RS** (1998) Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J* **13**: 653

- Monroy AF, Sarhan F, Dhindsa RS** (1993b) Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. *Plant Physiol* **102**: 1127
- Moon B, Higashi S, Gombos Z, Murata N** (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6219-6223
- Moreau D, Salon C, Munier-Jolain N** (2006) Using a standard framework for the phenotypic analysis of *Medicago truncatula*: an effective method for characterizing the plant material used for functional genomics approaches. *Plant Cell Environ* **29**: 1087-1098
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H** (2002) Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **94**: 390-394
- Muller P, Li X-P, Niyogi KK** (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol* **125**: 1558-1566
- Mun J-H, Kim D-J, Choi H-K, Gish J, Debelle F, Mudge J, Denny R, Endre G, Saurat O, Dudez AM, Kis GB, Roe B, Young ND, Cook DR** (2006) Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. *Genetics* **172**: 2541-2555
- Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I** (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**: 710-713
- Murfet IC** (1973) Flowering in *Pisum. Hr*, a gene for high response to photoperiod. *Heredity* **31**: 157-164
- Murray GA, Eser D, Gusta LV, Etévé G** (1988) Winterhardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. *In* RJ Summerfield, ed, *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 831-843
- Myers SC** (1988) Commodity information - Small Fruit. *In* JD Gibson, ed, *Cold Weather and Horticultural Crops in Georgia: Effects and Protective Measures*. Extension Horticulture Department, University of Georgia, Public. No. 286, pp 15-20
- Nagao M, Minami A, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D** (2005) Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *J Plant Physiol* **162**: 169-180
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H** (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* **10**: 339-346
- Nakayama S, Daido H, Abe J** (1997) Winter hardiness and growth at low temperature in European varieties of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Grassl Sci* **43**: 224-230
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* **34**: 137-148
- Nisi Pd, Zocchi G** (1996) The role of calcium in the cold shock responses. *Plant Science (Limerick)* **121**: 161-166

- Nordin Henriksson K, Trewavas AJ** (2003) The effect of short-term low-temperature treatments on gene expression in *Arabidopsis* correlates with changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *Plant Cell Environ* **26**: 485-496
- Norman EG, Walton AB, Turpin DH** (1994) Immediate activation of respiration in *Petroselinum crispum* L. in response to the *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicitor. *Plant Physiol* **106**: 1541-1546
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J** (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3985-3990
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV** (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **45**: 263-279
- Oh S, Song S, Kim Y, Jang H, Kim S, Kim M, Kim Y, Nahm B, Kim J** (2005) *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol* **138**: 341-351
- Okubara PA, Pawlowski K, Murphy TM, Berry AM** (1999) Symbiotic root nodules of the actinorhizal plant *Datisca glomerata* express Rubisco activase mRNA. *Plant Physiol* **120**: 411-420
- Olien CR, Clark JL** (1993) Changes in soluble carbohydrate composition of barley, wheat, and rye during winter. *Agron J* **85**: 21-29
- Oono Y, Seki M, Satou M, Iida K, Akiyama K, Sakurai T, Fujita M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* **6**: 212-234
- Oquist G, Hurry VM, Huner NPA** (1993) Low-Temperature Effects on Photosynthesis and Correlation with Freezing Tolerance in Spring and Winter Cultivars of Wheat and Rye. *Plant Physiol* **101**: 245-250
- Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS** (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J* **23**: 785-794
- Osmond CB** (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In RR BAKER, JR BOWYER, eds, *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publications, Oxford, pp 1-24
- Palta JP, Paul HL** (1980) Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory. *Physiol Plant* **50**: 169-175
- Pang PP, Meyerowitz EM** (1987) *Arabidopsis thaliana*: a model system for plant molecular biology. *Bio/Technology* **5**: 1177-1181
- Parker J** (1963) Cold resistance in woody plants. *Bot Rev* **29**: 124-201
- Paul MJ, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**: 1383-1400
- Pearce RS** (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul* **29**: 47-76

- Pearce RS** (2001) Plant freezing and damage. *Ann Bot* **87**: 417-424
- Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D** (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* **47**: 493-500
- Penmetsa RV, Cook DR** (1997) A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science (Washington)* **275**: 527-530
- Penmetsa RV, Cook DR** (2000) Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **123**: 1387-1397
- Pennycooke JC, Cheng H, Stockinger EJ** (2008) Comparative Genomic Sequence and Expression Analyses of *Medicago truncatula* and Alfalfa Subspecies *falcata* COLD-ACCLIMATION-SPECIFIC Genes. *Plant Physiol* **146**: 1242-1254
- Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G** (2000) Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Lett* **467**: 206-210
- Persson S, Rosenquist M, Svensson K, Galvao R, Boss WF, Sommarin M** (2003) Phylogenetic analyses and expression studies reveal two distinct groups of calreticulin isoforms in higher plants. *Plant Physiol* **133**: 1385-1396
- Persson S, Wyatt SE, Love J, Thompson WF, Robertson D, Boss WF** (2001) The Ca<sup>2+</sup> status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. *Plant Physiol* **126**: 1092-1104
- Pihakaski-Maunsbach K, Moffatt B, Testillano P, Risueno M, Yeh S, Griffith M, Maunsbach AB** (2001) Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter rye shoots. *Physiol Plant* **112**: 359-371
- Plieth C, Sattelmacher B, Hansen UP, Knight MR** (1999) Low-pH-mediated elevations in cytosolic calcium are inhibited by aluminium: a potential mechanism for aluminium toxicity. *Plant J* **18**: 643-650
- Pokorna J, Schwarzerova K, Zelenkova S, Petrasek J, Janotova I, Capkova V, Opatrny Z** (2004) Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells. *Plant Cell Environ* **27**: 641-653
- Pragya S, Nidhi S, Renu D** (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays* **27**: 1048-1059
- Prasil IT, Prasilova P, Pankova K** (2004) Relationships among vernalization, shoot apex development and frost tolerance in wheat. *Ann Bot* **94**: 413-418
- Prosperi JM** (2000) The genus *Medicago* and the genetic resources of *Medicago truncatula*. *Grain Legumes* **28**: 14-15
- Puhakainen T** (2004) *Physiological and Molecular Analyses of Cold Acclimation of Plants*. University of Helsinki, Helsinki
- Qiang L, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1391-1406

- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol* **45**: 1042-1052
- Quamme HA, Chen PM, Gusta LV** (1982) Relationships of deep supercooling and dehydration resistance to freezing injury in dormant stem tissues of "Starkrimson Delicious" apple and "Siberian C" peach. *J Am Soc Hortic Sci* **107**: 299-304
- R**ajashekar **CB, Li PH, Carter JV** (1983) Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-bearing *Solanum* species. Ice nucleation activity of external source of nucleants. *Plant Physiol* **71**: 749-755
- Rasmussen DH, McKenzie AP** (1972) Effect of solutes on ice-interfacial free-energy; calculation from measured homogeneous nucleation temperature. *In* HHG Jellnek, ed, *Water Structure at the Polymer Interfaces*. Plenum Pub. Corp., New-York, pp 126-145
- Reddy VS, Reddy ASN** (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* **65**: 1745-1776
- Reed ML, Graham D** (1981) Carbonic anhydrase in plants: distribution, properties and possible physiological roles. *In* L Reinhold, JB Harborn, T Swain, eds, *Progress in Phytochemistry 7*. Pergamon Press, Oxford pp 47-94
- Renaut J, Hoffmann L, Hausman JF** (2005) Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiol Plant* **125**: 82-94
- Richardson AD, Duigan SP, Berlyn GP** (2002) An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol* **153**: 185-194
- Rinne P, Welling A, Kaikuranta P** (1998) Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype. *Plant Cell Environ* **21**: 601-611
- Rinne PLH, Kaikuranta PLM, Plas LHWvd, Schoot Cvd** (1999) Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta* **209**: 377-388
- Ritte G, Lorberth R, Steup M** (2000) Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant J* **21**: 387-391
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL, Prospero JM** (2006) Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* **6**
- Rosenqvist E, van Kooten O** (2003) Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. *In* JR DeEll, PMA Toivonen, eds, *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer Academic Publishers, pp 31-78
- Routaboul J-M, Fischer SF, Browse J** (2000) Trienoic Fatty Acids Are Required to Maintain Chloroplast Function at Low Temperatures. *Plant Physiol* **124**: 1697-1705
- Rudd JJ, Franklin-Tong VE** (2001) Unravelling response-specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling pathways in plant cells. *New Phytol* **151**: 7-33
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrajs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkotter M** (2004) The FunCat, a functional annotation

- scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: 5539
- Rukavina H, Hughes HG, Qian Y** (2007) Freezing tolerance of 27 saltgrass ecotypes from three cold hardiness zones. *Hortscience* **42**: 157-160
- Rundel PW** (1989) Ecological success in relation to plant form and function in the woody legumes. *Advances in legume biology, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **29**: 377-398
- Ryu SB, Costa A, Xin Z, Li PH** (1995) Induction of Cold Hardiness by Salt Stress Involves Synthesis of Cold- and Abscisic Acid-Responsive Proteins in Potato (*Solanum commersonii* Dun). *Plant Cell Physiol* **36**: 1245-1251
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, Duc G** (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after gamma - ray mutagenesis. *Plant Science (Limerick)* **111**: 63-71
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K** (2000) Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* **23**: 319-327
- Saito K, Hayano-Saito Y, Maruyama-Funatsuki W, Sato Y, Kato A** (2004) Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus Ctb1 for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor Appl Genet* **109**: 515-522
- Sakai A** (1960) Survival of the twig of woody plants at -196°C. *Nature, UK* **185**: 393-394
- Sakai A, Larcher W** (1987) Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *In* Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin Germany, p 321 pp.
- Salamov AA, Solovyev VV** (2000) Ab initio Gene Finding in Drosophila Genomic DNA. *Genome Res* **10**: 516
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**: s401-s417
- Sangwan V, Orvar BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS** (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J* **31**: 629-638
- Sanjeeva S, Rahman MH, Shah S, Kav NNV** (2006) Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 529-549
- Sarhan F, Ouellet F, Vazquez-Tello A** (1997) The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiol. Plant.* **101**: 439
- Sassenrath GF, Ort DR, Portis AR, Jr.** (1990) Impaired reductive activation of stromal bisphosphatases in tomato leaves following low-temperature exposure at high light. *Arch Biochem Biophys* **282**: 302-308
- Savitch LV, Gray GR, Huner NPA** (1997) Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta* **201**: 18-26



- Savitch LV, Leonardos ED, Krol M, Jansson S, Grodzinski B, Huner NPA, Oquist G** (2002) Two different strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation. *Plant Cell Environ* **25**: 761-771
- Schechter E** (1997) *Biochimie et Biophysique des Membranes: Aspects Structuraux et Fonctionnels*. Dunod, Paris, France **459**
- Schlesinger MJ** (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem* **265**: 12111-12114
- Scholte M, d'Erfurth I, Rippa S, Mondy S, Cosson V, Durand P, Breda C, Trinh H, Rodriguez-Llorente I, Kondorosi E, Schultze M, Kondorosi A, Ratet P** (2002) T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Mol Breed* **10**: 203-215
- Schwarzerová K, Pokorná J, Petrásek J, Zelenková S, Capková V, Janotová I, Opatrný Z** (2003) The structure of cortical cytoplasm in cold-treated tobacco cells: the role of the cytoskeleton and the endomembrane system. *Cell Biol Int* **27**: 263-265
- Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, Dudler R** (2000) Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J* **24**: 895-903
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Seong E, Guo J, Kim Y, Cho J, Lim C, Hur J, Wang M** (2007) Regulations of marker genes involved in biotic and abiotic stress by overexpression of the *AtNDPK2* gene in rice. *Biochem Biophys Res Commun* **363**: 126-132
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 217-223
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 410-417
- Shinwari ZK, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M** (1998) An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 161
- Siminovitch D, Cloutier Y** (1982) Twenty-four-hour induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by desiccation stress at room temperature in the dark. *Plant Physiol* **69**: 250-255
- Singh DP** (2003) *Stress Physiology*. New Age International Publishers
- Smyth GK** (2005) Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York
- Smyth GK, Speed T** (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**: 265-273
- Snedden WA, Fromm H** (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* **3**: 299-304
- Snedden WA, Fromm H** (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol* **151**: 35-66

- Snyder RL, de Melo-Abreu JP** (2005) Frost protection: fundamentals, practice, and economics, Vol 1. *In*. FAO. environment and natural resources series 10
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM, Martin PG** (1995) Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2647-2651
- Somersalo S, Krause GH** (1989) Photoinhibition at chilling temperature. Fluorescence characteristics of unhardened and cold-acclimated spinach leaves. *Planta* **177**: 409-416
- Somersalo S, Krause GH** (1990) Photoinhibition at chilling temperatures and effects of freezing stress on cold acclimated spinach leaves in the field. A fluorescence study. *Physiol Plant* **79**: 617-622
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA** (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* **435**: 637-645
- Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14570
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1035
- Stone JM, Palta JP, Bamberg JB, Weiss LS, Harbage JF** (1993) Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing *Solanum* species: evidence for independent genetic control of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7869-7873
- Strand A, Foyer CH, Gustafsson P, Gardestrom P, Hurry V** (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* **26**: 523-535
- Strand M, Öquist G** (1988) Effects of frost hardening, dehardening and freezing stress on in vivo chlorophyll fluorescence of seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Environ* **11**: 231-238
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G** (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116-1120
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H** (2003) Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J* **36**: 830-841

**T**adege M, Ratet P, Mysore KS (2005) Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. *Trends Plant Sci* **10**: 229-235

Tadege M, Wen JQ, He J, Tu HD, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, Ratet P, Mysore KS (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **54**: 335-347

- Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy AF, Dhindsa RS, Borg M** (1997) The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta* **203**: 442
- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Plant Physiology*, 4th Edition. Sinauer Associates
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 417-426
- Teulat B, Zoumarou-Wallis N, Rotter B, Ben Salem M, Bahri H, This D** (2003) QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments. *Theor Appl Genet* **108**: 181-188
- Teutonico RA, Yandell B, Satagopan JM, Ferreira ME, Palta JP, Osborn TC** (1995) Genetic analysis and mapping of genes controlling freezing tolerance in oilseed Brassica. *Mol Breed* **1**: 329-339
- Thomas JO** (2001) HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans* **29**: 395-401
- Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE** (1992) Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Rep* **11**: 113-117
- Thomas RJ, Sprent JI** (1983) Effect of low growth temperature on nodulation, growth and N<sub>2</sub> fixation of lines of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **72**: 112
- Thomas RJ, Sprent JI** (1984) The effects of temperature on vegetative and early reproductive growth of a cold-tolerant and a cold-sensitive line of *Phaseolus vulgaris* L. 1. Nodulation, growth and partitioning of dry matter, carbon and nitrogen. *Ann Bot* **53**: 579-588
- Thomashow MF** (1990) Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv Genet* **28**: 99
- Thomashow MF** (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 571-599
- Thomashow MF, Artus NN, Bloksberg A, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Wilhelm K, Uemura M, Webb M, Steponkus PL** (1996) Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*: function and regulation of COR genes. *In* Physical stresses in plants: genes and their products for tolerance. Proceedings of a workshop held at Maratea, Italy, 24-27 September 1995. Springer-Verlag, Berlin Germany, pp 71-81
- Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR, Zarka DG** (2001) Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiol Plant* **112**: 171-175
- Thoquet P, Gherardi M, Journet EP, Kereszt A, Ane JM, Prospero JM, Huguet T** (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol* **2**: (2 January 2002)
- Timmusk S, Wagner EGH** (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 951-959
- Tobin EM, Silverthorne J** (1985) Light Regulation of Gene Expression in Higher Plants. *Annual Reviews in Plant Physiology* **36**: 569-593

- Tolbert NE** (1981) Metabolic Pathways in Peroxisomes and Glyoxysomes. Annual Reviews in Biochemistry **50**: 133-157
- Trevaskis B, Bagnall DJ, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES** (2003) MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. Proceedings of the National Academy of Sciences **100**: 13099
- Trieu AT, Harrison MJ** (1996) Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. Plant Cell Rep **16**: 6-11
- Trinh TH, Ratet P, Kondorosi E, Durand P, Kamate K, Bauer P, Kondorosi A** (1998) Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. Plant Cell Rep **17**: 345-355
- Tu JC, McDonnell MM** (1984) Effect of rhizobial inoculation and nodulation on yield and winter survival of some alfalfa cultivars. Can J Plant Sci **64**: 151-159

- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL** (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. Plant Physiol **109**: 15
- Uemura M, Steponkus PL** (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. Plant Physiol **104**: 479-496
- Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A, Kawamura Y** (2006) Responses of the plasma membrane to low temperatures. Physiol Plant **126**: 81-89
- Uemura M, Yoshida S** (1984) Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). Plant Physiol **75**: 818-826
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 11632-11637

- Vagujfalvi A, Galiba G, Cattivelli L, Dubcovsky J** (2003) The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. MGG Mol Genet Genomics **269**: 60-67
- VandenBosch KA, Stacey G** (2003) Summaries of Legume Genomics Projects from around the Globe. Community Resources for Crops and Models. Plant Physiol **131**: 840-865
- Veena S, Foulds I, Jas S, Dhindsa RS** (2001) Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx. Plant J **27**: 1-12
- Viswanathan C, Zhu JH, Zhu JK** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci **12**: 444-451
- Viswanathan C, Zhu JK** (2002) Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **357**: 877-886

- Vogel JT, Zarka DG, Buskirk HAv, Fowler SG, Thomashow MF** (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant J* **41**: 195-211
- Voorrips RE** (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* **93**: 77-78
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Tvd, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**: 4407-4414
- Wahid A, Close TJ** (2007) Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* **51**: 104-109
- Walters RG** (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot* **56**: 435-447
- Wang J, Sun L, Zhang C, Chen G, Wang P, Shi D, LuChuanGen, Xu S** (2006) Physiological responses to low temperature stress in hybrid rice at seedling stage. *Acta Agronomica Sinica* **32**: 1049-1056
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB** (2007) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Wanner LA, Junttila O** (1999) Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **120**: 391-399
- Ward DA, Keys AJ** (1989) A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynth Res* **22**: 167-171
- Watson BS, Asirvatham VS, Wang LJ, Sumner LW** (2003) Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol* **131**: 1104-1123
- Webb MS, Uemura M, Steponkus PL** (1994) A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiol* **104**: 467-478
- Weiser CJ** (1970) Cold Resistance and Injury in Woody Plants: Knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage. *Science* **169**: 1269-1278
- Welin BV, Olson A, Nylander M, Palva ET** (1994) Characterization and differential expression of dhn/lea/rab-like genes during cold acclimation and drought stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **26**: 131
- Welling A, Moritz T, Palva ET, Junttila O** (2002) Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. *Plant Physiol* **129**: 1633-1641
- Weston E, Thorogood K, Vinti G, Lopez-Juez E** (2000) Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in Arabidopsis thaliana wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* **211**: 807-815
- White GF, Haas JE** (1975) Assessment of Research on Natural Hazards. The MIT Press, Cambridge Massachusetts. 1975. 487 p

- Williams JP, Khan MU, Wong D** (1992) Low temperature-induced fatty acid desaturation in *Brassica napus*: thermal deactivation and reactivation of the process. *Biochim Biophys Acta* **1128**: 275-279
- Wisniewski M, Fuller M, Glenn DM, Palta J, Carter J, Gusta L, Griffith M, Duman J** (2001) Factors involved in ice nucleation and propagation in plants: an overview based on new insights gained from the use of infrared thermography. *Buvisindi*: 41-47
- Wisniewski M, Lindow SE, Ashworth EN** (1997) Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiol* **113**: 327-334
- Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, Close TJ, Yu X, Griffith M** (1999) Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol Plant* **105**: 600-608
- Wisniewski ME, Bassett CL, Renaut J, Farrell R, Jr., Tworkoski T, Artlip TS** (2006) Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiol* **26**: 575-584
- Wojciechowski MF, Lavin M, Sanderson MJ** (2004) A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid mat K gene resolves many well-supported subclades within the family 1. *In*, Vol 91. Botanical Soc America, pp 1846-1862

**X**in Z, Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* **23**: 893-902

**Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu J** (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **15**: 1971-1984

- Y**adegari LZ, Heidari R, Carapetian J (2007) The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. *J Biol Sci* **7**: 1436-1441
- Yamada T, Kuroda K, Jitsuyama Y, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S** (2002) Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* **215**: 770-778
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J** (2004) The Wheat VRN2 Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. *Science's STKE* **303**: 1640
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J** (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6263

- Yan X, Khan S, Hase T, Emes MJ, Bowsher CG** (2006) Differential uptake of photosynthetic and non-photosynthetic proteins by pea root plastids. *FEBS Lett* **580**: 6509-6512
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP** (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15
- Yin Z, Rorat T, Szabala BM, Ziolkowska A, Malepszy S** (2006) Expression of a *Solanum soganandinum* SK3-type dehydrin enhances cold tolerance in transgenic cucumber seedlings. *Plant Sci* **170**: 1164-1172
- Yoshida S, Uemura M** (1984) Protein and lipid compositions of isolated plasma membranes from orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) and changes during cold acclimation. *Plant Physiol* **75**: 31-37
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim DJ, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S** (2005) Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **137**: 1174-1181
- Yu C, Murphy TM, Sung W, Lin C** (2002) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. *Funct Plant Biol* **29**: 1081-1087
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ** (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 337-349
- Zhang C-K, Lang P, Dane F, Ebel RC, Singh NK, Locy RD, Dozier WA** (2005) Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Rep* **23**: 764-769
- Zhang S, Wei Y, Pan H** (2007) Transgenic Rice Plants Expressing a Novel Antifreeze Glycopeptide Possess Resistance to Cold and Disease. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C* **62**: 583
- Zhou X, Chandrasekharan MB, Hall TC** (2004) High rooting frequency and functional analysis of GUS and GFP expression in transgenic *Medicago truncatula* A17. *New Phytol* **162**: 813-822
- Zhu H, Choi H-K, Cook DR, Shoemaker RC** (2005) Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol* **137**: 1189-1196
- Zhu HY, Cannon SB, Young ND, Cook DR** (2002) Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 529-539
- Zhu HY, Kim DJ, Baek JM, Choi HK, Ellis LC, Kuester H, McCombie WR, Peng HM, Cook DR** (2003) Syntenic relationships between *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* reveal extensive divergence of genome organization. *Plant Physiol* **131**: 1018-1026
- Zhu S, Zhao H, Liang J, Ji B, Jiao D** (2008) Relationships between phosphatidylglycerol molecular species of thylakoid membrane lipids and sensitivities to chilling-induced photoinhibition in rice. *J Integr Plant Biol* **50**: 194-202
- Zhu T, Budworth P, Han B, Brown D, Chang H, Zou G, Wang X** (2001) Toward elucidating the global gene expression patterns of developing *Arabidopsis*: parallel

analysis of 8 300 genes by a high-density oligonucleotide probe array. *Plant Physiol Biochem* **39**: 221-242



# Colocalisation de gènes candidats positionnels avec des QTL de la tolérance au gel chez *Medicago truncatula*

Komlan Avia

La plupart des plantes des régions tempérées augmentent leur niveau de tolérance au gel en réponse principalement aux basses températures non gélives, par le biais d'un processus appelé acclimatation au froid. L'acclimatation au froid induit de multiples réponses associées à des changements physiologiques et biochimiques, aussi bien qu'à des modifications dans l'expression des gènes. Ces gènes peuvent être subdivisés en deux grands groupes : le groupe des gènes codant pour des enzymes ou des composants structuraux qui participent directement à la protection des cellules contre les dommages dus au gel (protéines LEA comme les déhydrines, enzymes de détoxification et des chaperonnes, etc.) et le groupe des facteurs de transcription et autres protéines de régulation (ex : gènes *CBF*). La tolérance au gel est un caractère quantitatif impliquant de nombreux facteurs contrôlés par un ensemble de gènes. Pour mieux comprendre son déterminisme dans le cas particulier des Légumineuses et ainsi améliorer la tolérance au gel d'espèces agronomiques comme le pois (*Pisum sativum*), l'espèce modèle *Medicago truncatula* (2n=16) est utilisée. Le choix de ce modèle permet de travailler sur un génome plus petit mais très synthétique avec celui du pois. Ce modèle servira ainsi à identifier des zones du génome impliquées dans la variation de caractères (QTL : Quantitative trait loci) liés à la tolérance au gel.

L'objectif de la thèse est d'identifier les déterminants génétiques impliqués dans la réponse à cette contrainte qu'est le gel chez *Medicago truncatula*. Plus précisément nous nous sommes attachés à identifier les principaux métabolismes impliqués et à rechercher les déterminants génétiques associés en utilisant une approche 'gènes candidats'.

La variabilité de la tolérance au gel d'une population de lignées recombinantes (LR3, 178 individus) issue d'un croisement entre deux lignées ayant des niveaux de tolérance au gel contrastés (F83005.5, tolérant et DZA045-5, sensible) a été étudiée. Pour ce faire, un protocole expérimental en chambre climatisée a été mis au point sur les deux lignées parentales : il est fondé sur l'exposition des plantules à des températures optimales puis basses avant une période de gel et sur un système de notation globale de dégâts de gel. Il a permis de caractériser l'ensemble de la population pour sa tolérance au gel. La détection de QTL de note globale de dégâts de gel sur une carte génétique de 182 marqueurs (un marqueur tous les 7 cM environ) a mis en évidence des zones d'intérêt sur les groupes de liaison 1, 4 et 6.

Afin de mieux comprendre quels sont les facteurs impliqués dans la capacité d'acclimatation au froid, des caractères écophysiologiques tels que la biomasse (aérienne et racinaire), le nombre de feuilles, la surface foliaire ainsi que le niveau d'endommagement des cellules foliaires (évalué par la conductivité des électrolytes libérés par les cellules via leurs membranes endommagées), et la teneur en chlorophylle, ont été mesurés.

Des colocalisations entre les QTL de ces caractères écophysiologiques et ceux des notes globales de dégâts de gel ont été identifiées sur les groupes de liaison 1, 4 et 6.

Parallèlement à ces études de QTL, les teneurs en trois sucres (glucose, fructose et saccharose) ont été mesurées dans les feuilles et les racines des deux lignées parentales à différents stades d'une cinétique d'acclimatation et comparées à une cinétique sans acclimatation. Les résultats ont montré un effet significatif de l'acclimatation sur l'accumulation des sucres dans les organes, principalement dans les racines, avec des teneurs plus élevées chez le parent tolérant. Les activités initiale et totale de la Rubisco ont également été dosées avec des résultats moins nets que pour les teneurs en sucres.

Afin d'identifier les gènes impliqués dans le processus d'acclimatation au froid chez *Medicago truncatula*, une étude transcriptomique (hybridation sur puce d'oligonucléotides de 16000 gènes) à partir d'ARNm des deux lignées parentales a également été conduite au cours d'une cinétique d'acclimatation. On a ainsi pu détecter 400 gènes différentiellement exprimés chez le parent tolérant par rapport au parent sensible au gel. Une analyse *in silico* a été réalisée pour identifier parmi les gènes régulés ceux qui sont localisés dans les intervalles des QTL. A partir de ces résultats, des perspectives sont proposées pour faciliter l'identification de gènes candidats de la tolérance au gel chez le pois et donc la création de variétés plus tolérantes.

Dans le cadre de ces perspectives, j'ai pu proposer, d'abord pour continuer le travail chez *Medicago truncatula*, de compléter la détection de QTL pour d'autres caractères tels que les sucres (déjà testés sur les deux lignées parentales) ou la fluorescence chlorophyllienne ( $F_v/F_m$ ) qui reflète l'efficacité de la photosynthèse, déterminante dans les conditions de stress au froid. J'ai également proposé que les résultats obtenus puissent être validés en conditions naturelles (au champ) et que les QTL soient confirmés dans d'autres fonds génétiques que celui utilisé. Parmi les trois groupes de liaison les plus intéressants mis en évidence, le GL6 possède les QTL à effets les plus forts, dont un QTL de dégât de gel avec un coefficient de détermination de 40%. On pourrait donc s'y concentrer dans un premier temps pour valider les résultats, notamment en rajoutant de nouveaux marqueurs dans l'intervalle des QTL pour le réduire et en utilisant des lignées quasi-isogéniques pour détecter plus finement les gènes les plus intéressants. La facilité de transformation de *Medicago truncatula* par *Agrobacterium tumefaciens* est une caractéristique très importante dans la validation des gènes retenus.

Pour transférer les résultats obtenus vers le pois, la stratégie proposée est d'abord la cartographie comparée des QTL et des gènes entre *Medicago truncatula* et le pois. Une recherche chez le pois des orthologues des gènes validés chez *Medicago truncatula* permettra de comparer la localisation de ces gènes à celle des QTL de dégâts de gel déjà cartographiés chez le pois. Les gènes les plus intéressants chez le pois pourront alors être clonés (clonage positionnel) et validés en utilisant notamment l'importante collection de mutants de TILLING hébergée à l'INRA de Dijon, ou une stratégie de génie génétique telle que l'ARN interférence.

**MOTS CLEFS** : *Medicago truncatula*, tolérance au gel, acclimatation au froid, QTL, carte génétique, gènes candidats, facteurs de transcription, lignées recombinantes, étude transcriptomique, analyse *in silico*, pois.